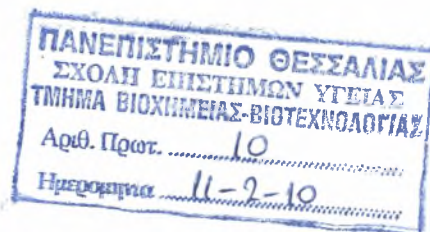




# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

«Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος»



Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από μέντα,  
φασκόμηλο και τσάι με συνδυασμό *in vitro* μεθόδων



ΡΕΡΗ ΕΛΕΝΗ



Λάρισα 2010



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8107/1  
Ημερ. Εισ.: 22-04-2010  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
547.6  
PEP

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087092

Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από μέντα, φασκόμηλο & τσάι με  
συνδυασμό *in vitro* μεθόδων

**Τριμελής Συμβουλευτικής Επιτροπή**

**Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη:

**Κομιώτης Δημήτριος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία, που μου έδωσε, να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις, που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους υποψήφιους διδάκτορες Χρύσα Σπανού και Άρη Βεσκούκη για την πολύτιμη βοήθεια και προθυμία τους να με καθοδηγήσουν και να λύσουν κάθε απορία μου, τόσο κατά την εκτέλεση του πειράματος, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη, την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα και συνεργατικό κλίμα, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

## Περίληψη

Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι σχετίζονται με πολλές ασθένειες. Τα φυτικά εκχυλίσματα πολλών αρωματικών και άλλων φυτών είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές αντιοξειδωτικές και βιολογικές ιδιότητες λόγω της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και κατ' επέκταση να δρουν σαν αντιοξειδωτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Σε μεγάλο αριθμό μελετών πολλά είδη αρωματικών φυτών φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιμεταλλαξιγόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων ενδημικών ποικιλιών φασκόμηλου, μέντας, τσαγιού και ροδιού. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> από αντιοξειδωτικές ενώσεις. Από τη μελέτη των συνολικά 27 εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών προέκυψε ότι όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης και με τις δύο ρίζες. Το εκχύλισμα του ροδιού παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ τα διάφορα είδη του τσαγιού τη χαμηλότερη. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ισχύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των δύο μεθόδων. Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση ( $r=0,780$  με  $p<0,01$ ). Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στη διαφορετική φύση των ριζών και στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

## Abstract

Free radicals and oxidative stress are considered to be related with a wide range of diseases. Extracts derived from herbs and spices are rich in polyphenolic compounds which have gained a lot of interest because of their antioxidant and chemopreventive properties. Many herb species have been recognized to have medicinal properties and beneficial impact on health by their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anti mutagenic and anticarcinogenic activity. The aim of the present study was to examine the antioxidant capacity of different species of *Salvia spp.*, *Mentha spp.*, *Sideritis spp.* and *Punica granatum*. The antioxidant capacity was estimated using two *in vitro* assays by assessing the extract scavenging capacity of DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> radicals. The antioxidant capacity of 27 herb extracts from *Labiatae* family was investigated. All tested extracts exhibited potent radical scavenging capacity of both radicals. The most potent scavenger was the extract of *Punica granatum* whereas the *Sideritis spp.* extracts were the less potent. According to the Spearman correlation coefficient derived from the comparison of the results of the two assays, it appears that there is a satisfactory correlation between them ( $r=0,780$  με  $p<0,01$ ). The differences observed could be attributed to the fact that DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> are two different radicals as well as to the different polyphenolic composition of the extracts.

## Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
Περιεχόμενα	7
Περιεχόμενα Πινάκων	9
Περιεχόμενα Εικόνων	10
Περιεχόμενα Γραφημάτων	11
<b>1. Εισαγωγή</b>	12
1.1. Ελεύθερες ρίζες	12
1.1.1. Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών	13
1.1.2. Δραστικές μορφές οξυγόνου	13
1.1.3. Δημιουργία Ελευθέρων ριζών σε βιολογικά συστήματα	14
1.1.4. Οξειδωτικό stress	14
1.2. Αντιοξειδωτικά	16
1.2.1. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών του οργανισμού	16
1.2.1.1. Ένζυμα με Αντιοξειδωτική Δράση	17
1.2.1.2. Μη ενζυμικές πρωτεΐνες	17
1.2.1.3. Αντιοξειδωτικές Ουσίες με Σχετικά Μικρό Μοριακό Βάρος	18
1.2.2. Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης	19
1.3. Χημειοπροστασία	20
1.3.1. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και η χημειοπροφύλαξη	20
1.3.2. Τα φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	21
1.4. Πολυφαινόλες	23
1.4.1. Κατηγορίες και πηγές πολυφαινολών	23
1.4.1.1. Φλαβονοειδή	24
1.4.1.2. Φαινολικά οξέα	25
1.4.1.3. Λιγνάνια	26
1.4.1.4. Στιλβένια	26
1.4.2. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των πολυφαινολών	27
1.5. Ανασκόπηση διαφόρων μεθόδων μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης	30
1.6. Οι βιολογικές - αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αρωματικών φυτών	32
1.6.1. Η Οικογένεια των Χειλανθών	33
1.6.1.1. Φασκόμηλο ( <i>Salvia spp.</i> )	34
1.6.1.2. Μέντα ( <i>Mentha spp.</i> )	35
1.6.1.3. Τσάι του βουνού ( <i>Sideritis spp.</i> )	37
1.6.1.4. Ρόδι ( <i>Punica granatum</i> )	38
1.7. Σκοπός του πειράματος	40
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b>	41
2.1. Υλικά	41
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	41
2.1.2. Εκχυλίσματα	41
2.1.3. Διαδικασία εκχύλισης	42
<b>2.2. Μέθοδοι</b>	43
2.2.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH	43
2.2.1.1. Αρχή της μεθόδου	43
2.2.1.2. Πειραματική διαδικασία	44



2.2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS	45
2.2.2.1. Αρχή της μεθόδου	45
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	46
2.2.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των δύο μεθόδων	47
2.2.4. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας	49
2.2.5. Στατιστική ανάλυση	49
<b>3. Αποτελέσματα</b>	50
3.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH*	50
3.1.1. Εκχυλίσματα μέντας	50
3.1.2. Εκχυλίσματα φασκόμηλου	51
3.1.3. Εκχυλίσματα τσαγιού και ροδιού	52
3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέντας, φασκόμηλου, τσαγιού και ροδιού μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS*	53
3.2.1. Εκχυλίσματα μέντας	53
3.2.2. Εκχυλίσματα φασκόμηλου	54
3.2.3. Εκχυλίσματα τσαγιού και ροδιού	55
3.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων και με τις δύο μεθόδους - DPPH Vs ABTS	56
3.3.1. Εκχυλίσματα μέντας	56
3.3.2. Εκχυλίσματα φασκόμηλου	57
3.3.3. Εκχυλίσματα τσαγιού και ροδιού	58
3.3.3.4. Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους	59
<b>4. Συζήτηση</b>	61
<b>5. Βιβλιογραφία</b>	65

## Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1	Δραστικές μορφές οξυγόνου .....	13
Πίνακας 2	Παραδείγματα τροφών με χημειοπροστατευτική δράση .....	22
Πίνακας 3	Μερικές διαιτητικές πηγές φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων .....	23
Πίνακας 4	Εκχυλίσματα Φασκόμηλου .....	41
Πίνακας 5	Εκχυλίσματα Μέντας .....	42
Πίνακας 6	εκχυλισμάτων ροδιού και τσαγιού .....	42
Πίνακας 7	Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων .....	44
Πίνακας 8	Έλεγχος απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη... ..	44
Πίνακας 9	Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων .....	47
Πίνακας 10	Έλεγχος απορρόφηση κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλης ....	47
Πίνακας 11	Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην ρίζα <i>DPPH</i> <sup>*</sup> .....	50
Πίνακας 12	Επίδραση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου στην ρίζα <i>DPPH</i> <sup>*</sup> .....	51
Πίνακας 13	Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού και ροδιού στην ρίζα <i>DPPH</i> <sup>*</sup> .....	52
Πίνακας 14	Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην ρίζα <i>ABTS</i> <sup>*+</sup> .....	53
Πίνακας 15	Επίδραση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου στην ρίζα <i>ABTS</i> <sup>*+</sup> .....	54
Πίνακας 16	Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού στην ρίζα <i>ABTS</i> <sup>*+</sup> .....	55
Πίνακας 17	Τιμές <i>IC</i> <sub>50</sub> των εκχυλισμάτων μέντας και με τις δύο μεθόδους .....	56
Πίνακας 18	Τιμές <i>IC</i> <sub>50</sub> των εκχυλισμάτων φασκόμηλου και με τις δύο μεθόδους .....	57
Πίνακας 19	Τιμές <i>IC</i> <sub>50</sub> των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού και με τις δύο μεθόδους ....	58

## Περιεγόμενα Εικόνων

<b>Εικόνα 1</b> Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας.....	12
<b>Εικόνα 2</b> Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την αναπνευστική αλυσίδα .....	14
<b>Εικόνα 3</b> Οξειδωτικό στρες.....	15
<b>Εικόνα 4</b> Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών .....	15
<b>Εικόνα 5</b> Οξειδωτικό στρες και ασθένειες.....	16
<b>Εικόνα 6</b> Δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων .....	20
<b>Εικόνα 7</b> Χαρακτηριστικές δομές υποκατηγοριών φλαβονοειδών.....	24
<b>Εικόνα 8</b> Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων .....	25
<b>Εικόνα 9</b> Χαρακτηριστική δομή λιγνανίων .....	26
<b>Εικόνα 10</b> Χαρακτηριστική δομή στυλβενίων.....	26
<b>Εικόνα 11</b> Χαρακτηριστικές δομές φλαβονοειδών, που συνδέονται με την αντιοξειδωτική τους δράση .....	28
<b>Εικόνα 12</b> Είδη της οικογένειας <i>Labiatae</i> αποτελούν πρώτη ύλη για την παρασκευή φαρμάκων .....	33
<b>Εικόνα 13</b> Α <i>Salvia argentea</i> , Β <i>Salvia officinallis</i> , Γ <i>Salvia pomifera</i> Δ <i>Salvia fruticosa</i> Ε <i>Salvia sclarea</i> .....	34
<b>Εικόνα 14</b> Α <i>Mentha longifolia</i> Β <i>Mentha aquatica</i> Γ <i>Mentha pulegium</i> Δ <i>Mentha microphylla</i> .....	36
<b>Εικόνα 15</b> <i>Sideritis raeseri subsp. raeseri</i> .....	37
<b>Εικόνα 16</b> <i>Punica granatum</i> .....	39
<b>Εικόνα 17</b> Η αναγωγή του <i>DPPH</i> σε <i>DPPH·H</i> .....	43
<b>Εικόνα 18</b> Η οξείδωση του <i>ABTS</i> σε δραστική ρίζα.....	45
<b>Εικόνα 19</b> Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα <i>ABTS</i> ° .....	45

### Περιεχόμενα Γραφημάτων

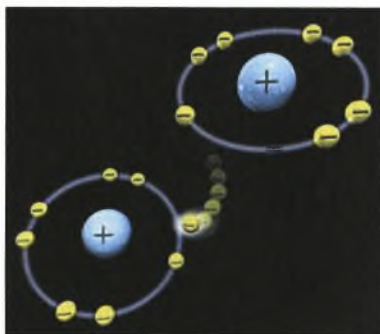
<b>Γράφημα 1</b>	Γραφική απεικόνιση των τιμών $IC_{50}$ των εκχυλισμάτων μέντας .....	50
<b>Γράφημα 2</b>	Γραφική απεικόνιση των τιμών $IC_{50}$ των εκχυλισμάτων φασκόμηλου.....	51
<b>Γράφημα 3</b>	Γραφική απεικόνιση των τιμών $IC_{50}$ των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού.....	52
<b>Γράφημα 4</b>	Γραφική απεικόνιση των τιμών $IC_{50}$ των εκχυλισμάτων μέντας .....	53
<b>Γράφημα 5</b>	Γραφική απεικόνιση των τιμών $IC_{50}$ των εκχυλισμάτων φασκόμηλου.....	54
<b>Γράφημα 6</b>	Γραφική απεικόνιση των τιμών $IC_{50}$ των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού.....	55
<b>Γράφημα 7</b>	Απεικόνιση των τιμών $IC_{50}$ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους .....	59
<b>Γράφημα 8</b>	Συσχέτιση των τιμών $IC_{50}$ των δύο μεθόδων .....	60

## 1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει δείξει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες και για τις αντιοξειδωτικές ουσίες, που μπορούν να βοηθήσουν τον οργανισμό να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες. Ο κύριος λόγος αυτού του ενδιαφέροντος είναι η αναγνώριση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των πολυφαινολών και του πιθανού ρόλου τους στη παρεμπόδιση πολλών ασθενειών, που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες (Dew, 2005).

### 1.1. Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο, που φέρει ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα του (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Όσο σταθερότερη είναι μία ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστηριότητα (Εικόνα 1). Έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell & Gutteridge, 1990; Cammac 1987). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al,1993; Wilson, 1978).



**Εικόνα 1** Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

### 1.1.1. Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κυρίως με τους παρακάτω τρόπους: (Valavanidis, 2006; Cheeseman et al, 1993)

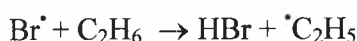
α. Ομολυτικές διασπάσεις όπου το ζεύγος ηλεκτρονίου διαχωρίζεται ομολυτικά:



β. Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με μεταφορά ηλεκτρονίου:



γ. Από την αντίδραση ριζών με άλλες οργανικές ενώσεις:



### 1.1.2. Δραστικές μορφές οξυγόνου

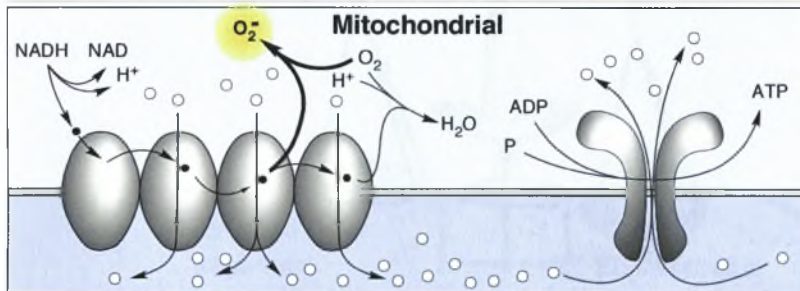
Από το σύνολο των ελευθέρων ριζών εκείνες, που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al,1993; Gutteridge, 1995). Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), μερικές μόνο από τις οποίες είναι ελεύθερες ρίζες (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Όνομα	Τύπος
Ρίζα του σουπεροξειδίου	$O_2^{\bullet -}$
Υδροξυλική ρίζα	$HO^{\bullet}$
Υδροξυπεροξυλική ρίζα	$H_2O^{\bullet}$
Υπεροξειδική ρίζα	$ROO^{\bullet}$
Αλκοξειδική ρίζα	$RO^{\bullet}$
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	$H_2O_2$
Οξείδιο του αζώτου	$NO^{\bullet}$

### 1.1.3. Δημιουργία Ελευθέρων ριζών σε βιολογικά συστήματα

Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στα βιολογικά συστήματα μέσα από φυσιολογικές διαδικασίες ή και από την επίδραση εξωτερικών παραγόντων, καθώς δημιουργούνται λόγω της διαρροής ηλεκτρονίων από τις μεμβράνες. Έτσι ελεύθερες ρίζες παράγονται από τις παρακάτω διαδικασίες (He et al 2002; Parke & Parke, 1995).



Εικόνα 2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την αναπνευστική αλυσίδα

- Ως παραπροϊόν κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων.(Εικόνα 2)
- Από τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες.
- Κατά τον κύκλο του ενζυμικού συστήματος κυτόχρωμα P450
- Από χημικές αντιδράσεις αναγωγής μεταλλικών ιόντων.
- Ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος.
- Κατά τον κύκλο αναγωγής των κινονών
- Κατά την βιοσύνθεση της προσταγλαδίνης

Εξωγενείς παράγοντες μπορούν επίσης να αποτελέσουν πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις κ.α.

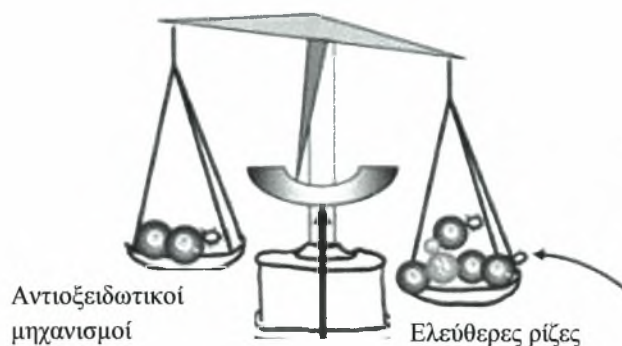
### 1.1.4. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 3) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).



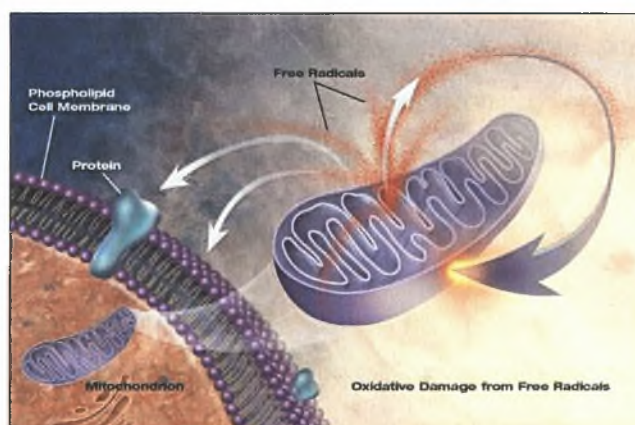
Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Παρουσία τοξικών ουσιών, που μεταβολίζονται και παράγουν ROS
- Υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παραγωγής ROS
- Σχετική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών παραγόντων



**Εικόνα 3** Οξειδωτικό στρες

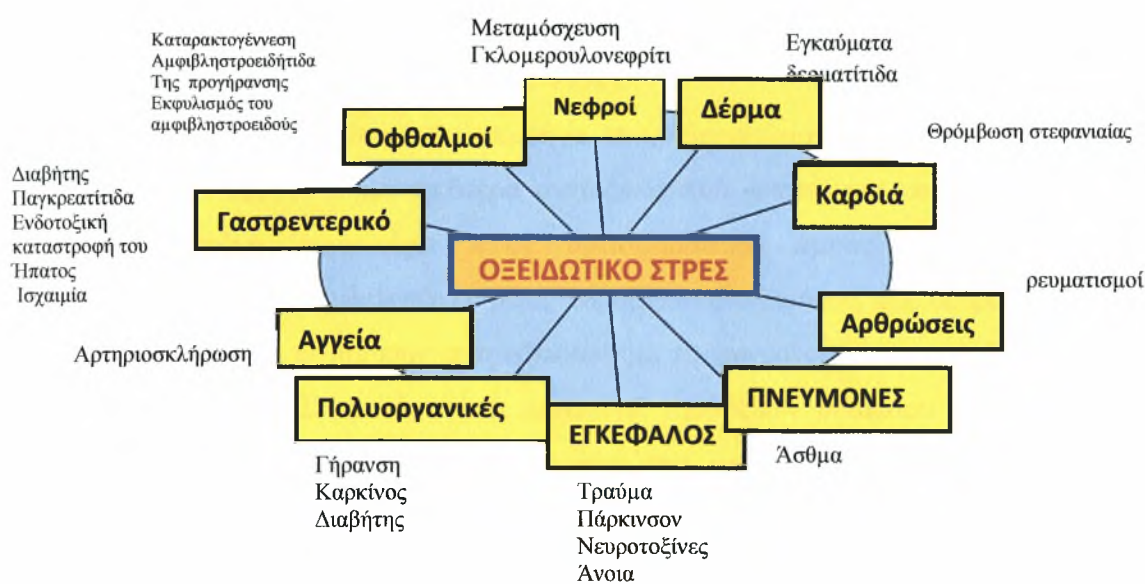
Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιομόρια, που είναι βασικά συστατικά του κυττάρου με αποτέλεσμα να συμβαίνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις και κατά συνέπεια την ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού υποστρώματος (Εικόνα 4). Έτσι οι πρωτεΐνες, που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν εύκολα με ελεύθερες ρίζες, προσβάλλονται πιο εύκολα και μετουσιώνονται (Lyrras et al, 1977). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, και να προκαλέσουν βλάβες τόσο στις βάσεις (πυρίνες, πυριμιδίνες) όσο και στη D –ριβόζη του DNA με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεταλλάξεις. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση και σχετίζονται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994).



**Εικόνα 4** Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών



Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001) (Εικόνα 5), για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), τον καρκίνο (Toyokuni1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αθροίτιδα (Parke et al., 1991) κ.ά.



**Εικόνα 5** Οξειδωτικό στρες και ασθένειες

## 1.2. Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα, έχει την ιδιότητα να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος (Halliwell, 2001).

### 1.2.1. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών του οργανισμού

Ένας λειτουργικός τρόπος τις διακρίνει σε ένζυμα, μη ενζυμικές πρωτεΐνες και μικρού μοριακού βάρους μόρια χωρίς ενζυμική δράση. Η τελευταία κατηγορία μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω σε υδρόφιλες και λιπόφιλες ενώσεις (Keaney & Vita, 1995).

#### 1.2.1.1. Ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση

- *Υπεροξειδική Δισμουτάση*: Επιδρά και ελαττώνει τον χρόνο ημίσειας ζωής των δραστικών ριζών οξυγόνου. Υπάρχουν τρεις μορφές υπεροξειδικής δισμουτάσης.
- *Καταλάση*: Διασπά το  $H_2O_2$  σε νερό και οξυγόνο, βρίσκεται στα υπεροξυσωμάτια, τα αιμοπετάλια και τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Loew, 1900 ).
- *Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης*: Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων (Van Kuijk et al., 1987). Δρα σε οργανικά υπεροξειδία, που απελευθερώνονται από τη δράση φωσφολιπασών καθώς και στο  $H_2O_2$  (Thomas et al., 1990).
- *Γλουταθειόνη*: Βρίσκεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια και είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού. Η γλουταθειόνη συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Εξουδετερώνει ρίζες υδροξυλίου, οξυγόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξειδίων με τη συνέργεια της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων διαμέσου μεμβρανών και επαναφέρει άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες στην ανηγμένη τους μορφή, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη (Masella et al., 2005).
- *Αναγωγάση της Γλουταθειόνης*: Είναι μια φλαβοπρωτεΐνη, που καταλύει τη μετατροπή του διμερούς της γλουταθειόνης στην ανηγμένη της μορφή (Pai and Schulz, 1983).

#### 1.2.1.2. Μη ενζυμικές πρωτεΐνες

- *Τρανσφερρίνη – Φερριτίνη*: Διατηρούν τον σίδηρο δεσμευμένο σε ανενεργή μορφή. Ο σίδηρος λειτουργεί ως συνένζυμο οξειδωτικών αντιδράσεων (αντιδράσεις Fenton) με αποτέλεσμα σε ελεύθερη κατάσταση να προάγει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Έτσι, οι παραπάνω ουσίες δρουν ως αντιοξειδωτικά δεσμεύοντάς τον.
- *Σερουλοπλασμίνη*: Εμπλέκεται με τη δέσμευση χαλκού και το μεταβολισμό του σιδήρου. Ο χαλκός συμμετέχει όπως και ο σίδηρος ως οξειδωτικό μέσο σε πληθώρα αντιδράσεων (Roeser et al., 1970).
- *Αλβουμίνη*: Είναι η πλέον διαδεδομένη πρωτεΐνη στο πλάσμα και κατέχει σημαντική θέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων (Hurst et al., 1999).

### 1.2.1.3. Αντιοξειδωτικές ουσίες με σχετικά μικρό μοριακό βάρος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι αντιοξειδωτικές ουσίες με σχετικά μικρό μοριακό βάρος διακρίνονται σε υδρόφιλες και λιπόφιλες. Οι κυριότερες από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω:

- *Ασκορβικό Οξύ* (Βιταμίνη C): Αποτελεί υδρόφιλο αντιοξειδωτικό με ιδιαίτερα ισχυρή δράση. Πηγές πλούσιες σε ασκορβικό οξύ αποτελούν τα λαχανικά και τα φρούτα και ιδιαίτερα τα εσπεριδοειδή. Η σημασία του ασκορβικού οξέος έγκειται στο γεγονός, ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με μια πληθώρα ελευθέρων ριζών όπως η ρίζα υδροξυλίου, το ατομικό και μοριακό οξυγόνο και οι ρίζες σουπεροξειδίου (Duthie, 1999) και δημιουργεί χηλικές ενώσεις με ιόντα χαλκού και σιδήρου εμποδίζοντας τη δράση τους (Sies et al., 1995).
- *Ουρικό Οξύ*: Το ουρικό οξύ στον οργανισμό βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο πλάσμα και κατέχει σημαντικότατο ρόλο στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Από τη μία πλευρά έχει βρεθεί ότι είναι από τις σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ουσίες ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελεί αρνητικό προγνωστικό δείκτη παθολογικών καταστάσεων (Waring, 2002).
- *Βιταμίνη E (α-Τοκοφερόλη)*: Η αντιοξειδωτική της δράση ασκείται μέσω προσφοράς του υδρογόνου του αρωματικού υδροξυλίου και η οξειδωμένη μορφή σταθεροποιείται μέσω διασποράς του ασύζευκτου ηλεκτρονίου εντός του αρωματικού δακτυλίου.
- *Συνένζυμο Q-10*: Βρίσκεται στα μιτοχόνδρια όπου χρησιμεύει για τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Εκτός από τη συμμετοχή στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας προστατεύει τα λιπίδια των μεμβρανών από τη δράση των ριζών (Kawamukai, 2002).
- *Καροτένια*: Είναι τετρατερπένια και τροφές πλούσιες σε αυτά είναι φρούτα με κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα καθώς και φυλλώδη λαχανικά με σκούρο πράσινο χρώμα. Η κυριότερη αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Paiva and Russell, 1999).

### 1.2.2. Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης

Ανάμεσα στους διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ανήκουν η εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, η χηλική δέσμευση μεταβατικών μετάλλων, η απενεργοποίηση και ενεργοποίηση ενζύμων και η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

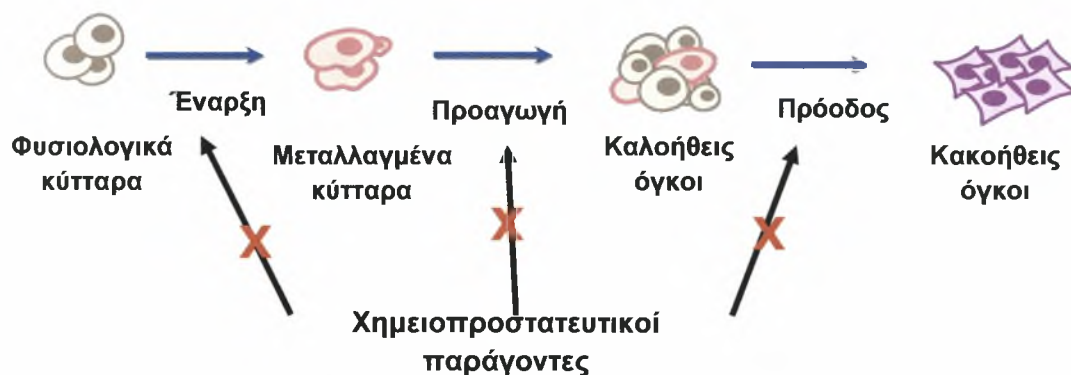
- *Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών:* Ορισμένες ενώσεις ανάγουν τις ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο. Αυτή η αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερο ή λιγότερο σταθερών τελικών προϊόντων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ενώσεων, που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), τα φλαβονοειδή και οι τοκοφερόλες (Kochlar & Russell, 1990).
- *Χηλική δέσμευση μεταβατικών μετάλλων:* Τα τρόφιμα περιέχουν μικρές ποσότητες μετάλλων (Co, Cu, Fe, Mn), ορισμένα από τα οποία επιταχύνουν την οξειδωση των ακόρεστων λιπιδίων. Τα μέταλλα αυτά δρουν ως προόξειδωτικά. Η χηλική δέσμευση των μετάλλων αυτών έχει ως συνέπεια τη μείωση της προοξειδωτικής δράση τους.
- *Απενεργοποίηση/Ενεργοποίηση ενζύμων:* Ορισμένα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις μετατροπής ενεργών μορφών οξυγόνου σε σταθερότερα προϊόντα ή αντιδράσεις για την δημιουργία ριζών. Έτσι η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση αντίστοιχα έχει αντιοξειδωτική δράση. Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου π.χ. ανάγει τη ρίζα σουπεροξειδίου προς μοριακό οξυγόνο (Donnelly & Robinson, 1991).
- *Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης:* Διαιτητικά στοιχεία όπως το σελήνιο έχουν αντιοξειδωτική δράση καθώς συμμετέχουν στο σχηματισμό λιπιδικών περοξειδίων των βιολογικών μεμβρανών και κατ' επέκταση την επιδιόρθωση της οξειδωτικής καταστροφής (Diplock, 1993). Οι πιο κοινοί στόχοι του οξειδωτικού στρες είναι οι βιολογικές μεμβράνες. Τα λιπαρά οξέα με κοντή αλυσίδα είναι γνωστό ότι προστατεύουν από τις ελεύθερες ρίζες, την φλεγμονή και τον καρκίνο, πιθανόν μέσω της εξουδετέρωσης ριζών ή της γρήγορης παραγωγής ενέργειας (Hill, 1995).

### 1.3. Χημειοπροστασία

#### 1.3.1. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και η χημειοπροστασία

Η καρκινογένεση είναι μία μεταβολική ασθένεια και διαιρείται σε τρεις φάσεις (Bishop 2000). Την αρχική (initiation), την φάση προαγωγής (promotion) και την φάση προόδου (progression). Στο πρώτο στάδιο συμβαίνουν οι γενετικές βλάβες στο DNA, στο δεύτερο στάδιο εμφανίζονται οι φαινοτυπικές ανωμαλίες και στο τρίτο στάδιο μέσω σύνθετων μηχανισμών, οι γενετικές και φαινοτυπικές ανωμαλίες. Ο καρκίνος αποτελεί μία πολυσύνθετη διεργασία σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μία εκτεταμένη χρονικά περίοδο μεταξύ της αρχικής φάσης της καρκινογένεσης μέχρι εμφάνισης της νόσου. Έτσι οι μελέτες στην χημειοπροστασία βασίζονται στην υπόθεση, ότι η διακοπή αυτής της μεταβολικής διαδικασίας, σε κάποιο από τα στάδια θα αναστείλει ή θα ανατρέψει την εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Ο όρος χημειοπροστασία χρησιμοποιείται στην πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφών. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροστατευτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια (Greenwald, 1995). (Εικόνα 6)



Εικόνα 6 Δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Σύμφωνα με την συμβατική ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Wattenberg (Wattenberg 1985) οι παράγοντες που εμφανίζουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι του καρκίνου μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες ομάδες: στους ανασταλτικούς παράγοντες (blocking agents) και στους κατασταλτικούς παράγοντες (suppressing agents). Οι ανασταλτικοί παράγοντες εμποδίζουν την προσέγγιση των ιστών-στόχων από τα



καρκινογόνα εμπλεκόμενοι στην μεταβολική τους ενεργοποίηση ή στην αλληλεπίδραση των ουσιών αυτών με σημαντικά μακρομόρια του κυττάρου (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Οι κατασταλτικοί παράγοντες παρεμποδίζουν την κακοήγη μεταμόρφωση των αρχικών κυττάρων είτε στη φάση προαγωγής είτε στη φάση προόδου.

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να παρεμποδίσουν ή να αναστρέψουν το προκαρκινογόνο στάδιο (αρχική φάση και φάση προαγωγής) της πολυσταδιακής καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί δράσης των φυτικών χημειοπροστατευτικών παραγόντων περιλαμβάνουν το μεταβολισμό των καρκινογόνων παραγόντων από τα ένζυμα του μεταβολισμού, την επιδιόρθωση του DNA, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την επίδραση στην κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση, την έκφραση και λειτουργική ενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την επίδραση στην αγγειογένεση και την μετάσταση καθώς και την ορμονική και αυξητική κατάσταση των κακοήθων κυττάρων (Caragay, 1992; Steinmetz et al, 1991).

### **1.3.2. Οι φυτοχημικές ουσίες ως αντιοξειδωτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες**

Από την αρχαιότητα τα φυτά έχουν αποτελέσει μια ανεξάντλητη πηγή φυσικών προϊόντων για την παραγωγή φαρμακευτικών θεραπευτικών ουσιών. Τα χημικά συστατικά των φυτικών κυττάρων τα οποία εκδηλώνουν βιολογικές δράσεις σε ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα, ανάλογα με την σχετική τους συγκέντρωση στα φυτά και την πρωταρχική λειτουργία τους, κατανέμονται σε δύο κύριες ομάδες: στους πρωτογενείς μεταβολίτες, η συσσώρευση των οποίων καλύπτει θρεπτικές και δομικές ανάγκες και στους δευτερογενείς μεταβολίτες που δρουν ως ορμόνες, φαρμακευτικές ουσίες και τοξίνες (Fereidoon, 1998).

Ο πρωτογενής μεταβολισμός αποτελεί το σύνολο των διαδικασιών που οδηγεί στην παραγωγή σακχάρων (υδατάνθρακες), αμινοξέων, λιπιδίων, θρεπτικών συστατικών και νουκλεοτιδίων. Οι ενώσεις αυτές συμμετέχουν στο 90% των βιολογικών διεργασιών και είναι απαραίτητες για την αύξηση και ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων.

Τους δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν ενώσεις, που ανήκουν σε εξαιρετικά διαφοροποιημένες χημικές ομάδες, όπως οργανικά οξέα, αρωματικές ενώσεις, τερπένια, στεροειδή, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, κ.α. Η δράση τους στα φυτά συνήθως σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού και της αύξησης, την απόδοση του αρώματος και του χρωματισμού των τμημάτων του φυτού και την προστασία έναντι κλιματολογικών συνθηκών και παθογόνων οργανισμών. Αν και ο δευτερογενής μεταβολισμός γενικά

αποτελεί το 10% του συνολικού μεταβολισμού στα φυτά, εντούτοις τα προϊόντα του αποτελούν τα κύρια συστατικά με φαρμακολογική δράση (Chadwick et al, 1992). Εξαιτίας των φυσιολογικών αυτών λειτουργιών, οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν στοιχία με πιθανή προστατευτική δράση απέναντι του καρκίνου. Οι ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά και εμφανίζουν χημειοπροστατευτική δράση μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις ακόλουθες ομάδες (Spiridon et al, 2004):

- Πολυφαινολικές ενώσεις
- Τερπένια
- Σουλφυδο-ενώσεις
- Γλυκοσινολάτες - Ισοθειοκυανάτες
- Αλκαλοειδή
- Χλωροφύλλη και τα παράγωγά της
- Σάκχαρα και παράγωγα σακχάρων
- Λιπαρά οξέα

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών οφείλεται στα βιοδραστικά τους συστατικά, τα οποία είναι μη θρεπτικά και έχουν σημαντική βιολογική δράση (Steinmetz et al, 1996). Για παράδειγμα, δρουν ως αντιοξειδωτικά και έχουν δράση παρόμοια με αυτή των ορμονών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαίνονται στον Πίνακα 2 .

Πίνακας 2 Παραδείγματα τροφών με χημειοπροστατευτική δράση

Φυτά	Βιοδραστικά στοιχεία
Cruciferous (μπρόκολα, λάχανο, Λαχανάκια Βρυξελλών,κουνουπίδι,παντζάρια)	Ινδόλες Ισοθειοκυανικά Θειόλες
Solanaceous (τομάτες, πιπεριές)	Λυκοπένιο
Umbelliferous (καρότα, σέλινο, μαϊντανός)	Καροτενοειδή Πολυακετυλένια
Citrus (πορτοκάλια, λεμόνια, γκρεϊπ-φρουτ)	Μονοτερπένια Καροτενοειδή
Φρούτα (σταφύλια, βατόμουρα, κεράσια, μήλα, καρπούζια, ρόδι)	Φαινολικά οξέα φλαβονοειδή
Σπέρματα (σόγια, κριθάρι, βρώμη, σιτάρι)	Φλαβονοειδή Πολυφαινολικά οξέα Σαπωνίνες
Βότανα (μέντα, θυμάρι, ρίγανη, βασιλικός, δενδρολίβανο, φασκόμηλο, μάραθος)	Φλαβονοειδή Τερπένια
Γλυκόριζα Πράσινο τσάι	Glycyrrhizin, Πολυφαινόλες

## 1.4. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια από τις πολυπληθέστερες και ευρύτατα διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών και έτσι αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής, τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων. Τα φρούτα και τα ροφήματα, όπως το τσάι και το κόκκινο κρασί, είναι οι κυριότερες πηγές πολυφαινολών, ωστόσο τα λαχανικά, τα ψυχανθή και τα δημητριακά, αποτελούν επίσης καλές πηγές (Urquiza & Leighton, 2000). Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών επιδράσεών τους στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al, 2005).

### 1.4.1. Κατηγορίες και πηγές πολυφαινολών

Στο φυτικό βασίλειο έχουν ταυτοποιηθεί πολλές χιλιάδες μόρια με πολυφαινολική δομή και συγκεκριμένα πάνω από 8000 φαινολικές δομές είναι γνωστές μέχρι σήμερα (Bravo, 1998). Οι πολυφαινόλες, που αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al., 2000). Ο όρος φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνει μεγάλο εύρος ουσιών, που διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο με μια ή περισσότερες υποκαταστάσεις υδροξυλομάδων (-OH). Οι πολυφαινόλες είναι ουσίες ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο (Πίνακας 3) (Morton et al, 2000). Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριο τους και των δομικών στοιχείων που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κυριότερες κατηγορίες πολυφαινολών είναι: τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και τις λιγνάνες.

**Πίνακας 3** Μερικές διαιτητικές πηγές φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων

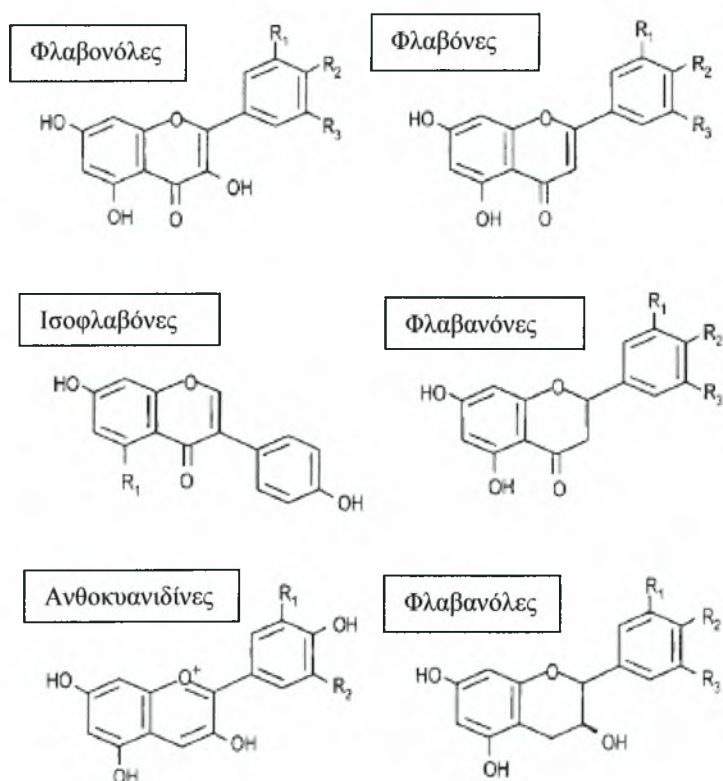
Φυτά	Βιοδραστικά στοιχεία
Κατεχίνες	Τσάι, Κόκκινο κρασί
Φλαβονοειδή	Εσπεριδοειδή
Φλαβονόλες	Κρεμμύδια, ελιές, τσάι. Μήλα
Ανθοκυανιδίνες	Κεράσια, φράουλες, σταφύλια , φρούτα με χρώμα
Καφεϊκό οξύ	Σταφύλια , κρασί, ελιές, καφές, μήλα, τομάτες, δαμάσκηνα, κεράσια δαμάσκηνα, κεράσια



#### 1.4.1.1. Φλαβονοειδή

Ο μεγαλύτερος όγκος της βιβλιογραφίας, που αφορά τις φυτικές πολυφαινόλες και ιδιαίτερα οι μελέτες που αναφέρονται στις φυσιολογικές τους επιδράσεις, επικεντρώνονται σε μια κυρίως κατηγορία πολυφαινολών, τα φλαβονοειδή. Το πρόσφατο ενδιαφέρον για αυτές τις ενώσεις οφείλεται στις πιθανές ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία, λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων (Heim et al., 2002). Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο συνήθη και ευρέως κατανεμημένη ομάδα φυτικών πολυφαινολών. Όσο αφορά στη χημική δομή τους, τα φλαβονοειδή μοιράζονται έναν κοινό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β), που συνδέονται μεταξύ τους μέσω τριών ατόμων C, τα οποία σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (δακτύλιος C). Περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα στα φυτά και η λίστα αυξάνεται σταθερά (Cheynier, 2005).

Τα φλαβονοειδή, που απαντώνται στη διατροφή διαφέρουν στη κατανομή των υδροξυλομάδων, των μεθοξυομάδων και των γλυκοζιτικών πλευρικών ομάδων, καθώς και στη σύζευξη μεταξύ των Α και Β δακτυλίων. Ανάλογα με τον τύπο του ετεροκυκλικού δακτυλίου, τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε 6 κατηγορίες: στις φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και στις φλαβανόλες. (Εικόνα 7)

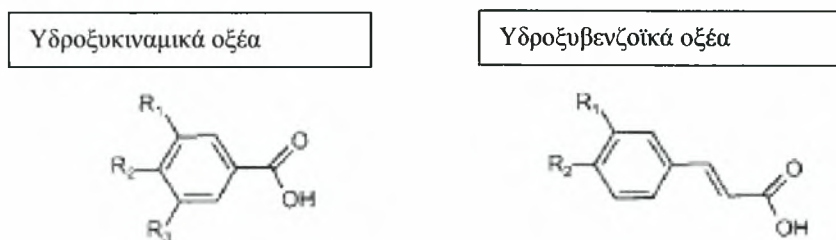


Εικόνα 7 Χαρακτηριστικές δομές υποκατηγοριών φλαβονοειδών

Οι φλαβονόλες αποτελούν την ομάδα φλαβονοειδών με την υψηλότερη συγκέντρωση στη διατροφή, ενώ οι κυριότερες ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η κερκετίνη και κεμπφερόλη. Το κόκκινο κρασί και το τσάι περιέχουν πάνω από 45 mg/L (Manach et al., 2004). Αυτές οι ενώσεις εμφανίζονται με την γλυκοζυλιωμένη τους μορφή. Τα συζευγμένα σάκχαρα είναι συνήθως η γλυκόζη ή η ραμνόζη. Οι ισοφλαβόνες είναι φλαβονοειδή με δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Αν και δεν είναι στεροειδή, έχουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', σε μια διαμόρφωση ανάλογη με τα υδροξύλια, στο μόριο της οιστραδιόλης. Αυτή η δομή προσδίδει στις ισοφλαβόνες ιδιότητα φυτοιστρογόνου, καθώς και την ικανότητα να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων, κατατάσσοντάς αυτές ως φυτο-οιστρογόνα. Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή. Η σόγια αποτελεί την κύρια πηγή τους στην ανθρώπινη διατροφή. Οι φλαβονόλες απαντώνται τόσο στη μονομερή μορφή τους (κατεχίνες), όσο και ως πολυμερείς ενώσεις (προανθοκυανιδίνες). Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλά είδη φρούτων και στο κόκκινο κρασί, όμως το πράσινο τσάι είναι μακράν η πλουσιότερη πηγή τους. Το εκχύλισμα του πράσινου τσαγιού περιέχει πάνω από 200 mg κατεχινών (Manach et al., 2004). Η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι οι κύριες φλαβονόλες στα φρούτα, ενώ η γαλοκατεχίνη, επιγαλοκατεχίνη, απαντώνται σε ορισμένα οσπριοειδή φυτά, στα σταφύλια, αλλά κυρίως στο τσάι.

#### 1.4.1.2. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν τη δεύτερη πιο διαδεδομένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων και βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα. Τα φαινολικά οξέα μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και παράγωγα του κινναμικού οξέος. Το πιο αντιπροσωπευτικό φαινολικό οξύ είναι το καφεϊκό οξύ, το οποίο βρίσκεται με την εστεροποιημένη του μορφή στα τρόφιμα. Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά οξέα είναι και το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το σιναπικό οξύ. (Εικόνα 8)

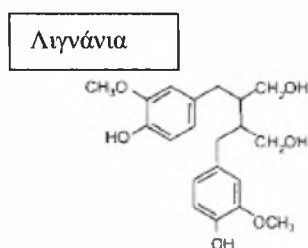


**Εικόνα 8** Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων

Το τσάι είναι μια σημαντική πηγή γαλλικού οξέος. Τα φύλλα τσαγιού μπορούν να περιέχουν πάνω από 4,5 g/Kg φρέσκου βάρους (Manach et al., 2004). Το φερουλικό οξύ, χαρακτηριστικό των δημητριακών, βρίσκεται συνδεδεμένο, ως trans φερουλικό οξύ, μέσω εστερικών δεσμών με μόρια ημικυτταρίνης και αραβινοξυλάνες στο περικάρπιο και στην αλευρόνη (Scalbert et al., 2000). Τα παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέος, αν και βρίσκονται σε όλα τα μέρη των φρούτων και των δημητριακών, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απαντούν στο εξωτερικό κυρίως τμήμα του καρπού (Manach et al., 2004).

#### 1.4.1.3. Λιγνάνια

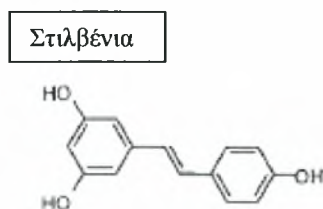
Τα λιγνάνια συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται σε διάφορες ουσίες, που είναι γνωστές για την δράση τους ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων (Εικόνα 9). Τα κύρια τρόφιμα τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες από λιγνάνια είναι ο λιναρόσπορος καθώς και το λάδι του. Μερικά δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν ίχνη από λιγνάνια.



Εικόνα 9 Χαρακτηριστική δομή λιγνανίων

#### 1.4.1.4. Στιλβένια

Τα στιλβένια απαντώνται σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου με εξαίρεση την trans-ρεσβερατρόλη, η οποία έχει αξιοπρόσεκτες βιολογικές δράσεις και βρίσκεται στο κρασί αλλά και στον φλοιό των κόκκινων σταφυλιών (Εικόνα 10) (Bhat, 2002).

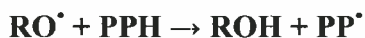


Εικόνα 10 Χαρακτηριστική δομή στιλβενίων

#### 1.4.2. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των πολυφαινολών

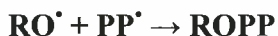
Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα μπορούν να δράσουν σαν αντιοξειδωτικά με διάφορους μηχανισμούς. Ο πιο σημαντικός από αυτούς είναι πιθανότατα μέσω της εξουδετέρωσης της ρίζας, κατά την οποία η πολυφαινόλη, διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών. Επιπλέον, ορισμένες πολυφαινόλες μπορεί να επάγουν ένζυμα με αποτέλεσμα να αυξηθεί η απέκκριση οξειδωτικών παραγόντων από τον οργανισμό, ή να αναστέλλουν ένζυμα, που έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, ή να προστατεύουν άλλα αντιοξειδωτικά, όπως τη γλουταθειόνη, τη βιταμίνη E, το β-καροτένιο και το λυκοπένιο από την οξείδωση.

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών και δεσμεύσουν μέταλλα τα οποία καταλύουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως π.χ. στην περίπτωση του ταννικού οξέος, που δημιουργώντας σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου, παρεμποδίζει τη σύνθεση ριζών υδροξυλίου από την αντίδραση Fenton (Lopes et al., 1999). Οι πολυφαινόλες δρουν κυρίως ως δότες κατιόντων H στις ελεύθερες ρίζες κατά την αντίδραση:



όπου ο σχηματιζόμενος μεταβολίτης, η ρίζα  $\text{PP}^\bullet$ , είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο και δύσκολα επιτρέπει μία νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Η ρίζα αυτή σταθεροποιείται με διασπορά των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων γύρω από τον αρωματικό δακτύλιο κατά το φαινόμενο του συντονισμού (Shahidi & Wanasundara, 1992).

Επίσης μπορεί να σταματήσει την αλυσιδωτή αντίδραση των ριζών αντιδρώντας με άλλες ρίζες όπως την παρακάτω αντίδραση:



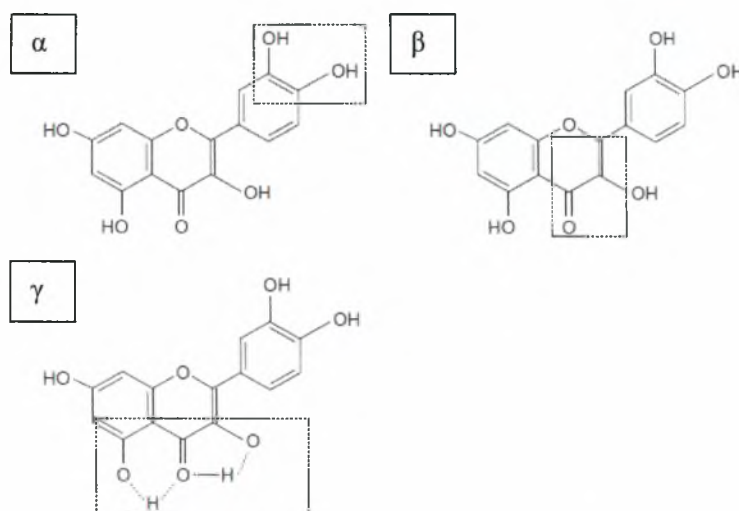
Ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί με θέμα την σχέση δομής και αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών (Bors et al., 1990; Chen et al., 1996; Rice-Evans et al., 1996; Van Acker et al., 1996; Cao et al., 1997). Τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα φλαβονοειδές, για να εξουδετερώσει μία ελεύθερη ρίζα και να παρουσιάσει κατ' επέκταση σημαντική αντιοξειδωτική δράση, μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

α. Μία ορθο-διυδροξυ (κατεχολική) δομή στον δακτύλιο Β.

β. Ένας 2,3 διπλός δεσμός σε συνδυασμό με μία κετο-ομάδα.

γ. Υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 5.

Τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11 Χαρακτηριστικές δομές φλαβονοειδών, που συνδέονται με την αντιοξειδωτική τους δράση

Έτσι για παράδειγμα, η κερκετίνη είναι μία από τις πιο σημαντικές πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση και αυτή οφείλεται κυρίως: α) στην ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου, η οποία είναι υπεύθυνη για τον εκτόπιση των ηλεκτρονίων από τον Β δακτύλιο, β) στην παρουσία κετο-ομάδας στον Β δακτύλιο, ικανό να λειτουργήσει ως δότης ή για να σταθεροποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και γ) στις ομάδες OH στη θέση 3 και 5, που αυξάνουν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Γενικά η θέση και ο βαθμός υδροξυλίωσης είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, όπως των φλαβονοειδών. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι αναγκαία για να είναι μία πολυφαινόλη αντιοξειδωτική (Williams et al., 2004).

Η δυνατότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τη μορφή των πολυφαινολών αλλά μειώνεται με την παρουσία σακχάρου στο μόριό τους. Οι γλυκοζίτες συνήθως δεν είναι αντιοξειδωτικές ουσίες, αν και τα αντίστοιχα ελεύθερα μόριά τους μπορούν να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Αν και οι συζευγμένες πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις και να δεσμεύουν ενεργά

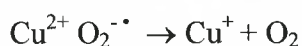
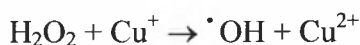


μόρια οξυγόνου ή αζώτου, η ικανότητά τους αυτή είναι κατά πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ελεύθερες πολυφαινόλες (Williams et al., 2004).

Τα φαινολικά οξέα μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, ειδικά εκείνα που διαθέτουν την δομή τύπου κατεχόλης, όπως το καφεϊκό οξύ (Laranjinha et al., 1994; Nardini et al., 1995; Abu-Amsha et al., 1996). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι απλά μόρια φαινολικών οξέων, όπως το 3-υδροξυανθρανιλικό οξύ, ίσως είναι ικανό συν-αντιοξειδωτικό για την α-τοκοφερόλη, ικανό να αναστείλει την υπεροξείδωση των λιποπρωτεϊνών και των λιπιδίων του πλάσματος στον άνθρωπο (Thomas et al., 1996).

Η πιθανή συνδυαστική δράση των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων με άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό οξύ ή η τοκοφερόλη είναι ακόμη ένας πιθανός μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης για αυτά τα συστατικά (Kandaswami et al., 1993). Με παρόμοιο τρόπο η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη με ασκορβικό και καφεϊκό ή κουμαρικό οξύ είχε σαν αποτέλεσμα την προστασία από την οξείδωση (Vieira et al., 1998).

Ένας άλλος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών, ειδικά σε συστήματα που υπάρχουν ιόντα μετάλλων, όπως ο χαλκός και ο σίδηρος είναι η δημιουργία χειλικών ενώσεων με τα μέταλλα. Η συμπλοκοποίηση των καταλυτικών αυτών μεταλλικών ιόντων, ίσως προστατεύει από την συμμετοχή τους σε αντιδράσεις τύπου Fenton, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ισχυρά δραστικών υδροξυλο-ριζών, όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις (Halliwell et al., 1995).



Έτσι για παράδειγμα, οι Manach et al. (1998) βρήκαν, ότι ορισμένα συζευγμένα μόρια της κερκετίνης έχουν την ικανότητα να μειώνουν την οξείδωση της LDL από μόρια χαλκού.

Η ικανότητα των πολυφαινολών να αντιδρούν με ιόντα μετάλλων, ίσως τα καθιστούν προοξειδωτικά. Για παράδειγμα, σε μία μελέτη των Cao et al. (1997), όπου χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά οξειδωτικά συστήματα, τα φλαβονοειδή είχαν αντιοξειδωτική δράση δεσμεύοντας τις ρίζες περοξυλίου που δημιουργήθηκαν από το AAPH, αλλά ήταν προοξειδωτικά παρουσία  $\text{Cu}^{2+}$ . Τα φλαβονοειδή μπορούν να ανάγουν τον  $\text{Cu}^{2+}$  σε  $\text{Cu}^+$  και να επιτρέψουν τον περαιτέρω σχηματισμό ανεξάρτητων ριζών. Το καφεϊκό οξύ φαίνεται επίσης να έχει προοξειδωτική δράση παρουσία  $\text{Cu}^{2+}$  ο οποίος οδηγεί σε οξείδωση της LDL (Yamanaka et al., 1997).

Πρέπει να σημειωθεί, ότι αυτή η προοξειδωτική δράση έχει παρατηρηθεί μόνο στην φάση προαγωγής και όχι στην φάση έναρξης κατά την οποία το καφεϊκό οξύ αναστέλλει την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης, όπως έχει εξακριβωθεί σε προηγούμενες μελέτες (Laranjinha *et al.*, 1994; Nardini *et al.*, 1995; Abu-Amsha *et al.*, 1996). Η πιθανή προοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, ίσως είναι σημαντική *in vivo*, εάν τα ιόντα μετάλλων εμπλέκονται σε διαδικασίες οξείδωσης.

Άλλες βιολογικές δράσεις τη φαινολικών συστατικών έχουν σημειωθεί, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία. Φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη και η κατεχίνη μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και να αυξήσουν την αντιοξειδωτική τους δράση ή ακόμα και αν τα ίδια δεν δρουν ως αντιοξειδωτικά, να αυξάνουν τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Nagata *et al.*, 1999). Ακόμη το καφεϊκό οξύ έχει βρεθεί ότι έχει κυτταροπροστατευτικό ρόλο σε ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που σχετίζεται όχι μόνο με την αντιοξειδωτική του δράση, αλλά και με την ικανότητα του να μπλοκάρει την αύξηση του διακυτταρικού ασβεστίου, απόκριση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών (Vieira *et al.*, 1998). Μερικά φαινολικά συστατικά πιθανόν να αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Pace-Asciak *et al.*, 1996), ενώ άλλα πιθανόν δρουν σαν αναστολείς του παράγοντα NF-kB του πυρήνα (Natarajan *et al.*, 1996). Η ικανότητα των πολυφαινολών να παγιδεύουν ηλεκτρόφιλους παράγοντες μετάλλαξης, ίσως επίσης προστατεύει βιολογικά μόρια από την καταστροφή (Kato *et al.*, 1997).

### **1.5. Ανασκόπηση διαφόρων μεθόδων μελέτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Πολλές μέθοδοι *in vitro* έχουν αναπτυχθεί για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων βιολογικών δειγμάτων. Οι παρακάτω μέθοδοι δίνουν την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός δείγματος (πχ. φυτικό εκχύλισμα), λόγω της αυτονόητης δυσκολίας διαχωρισμού και μέτρησης κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά και των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών που αποτελούν τα σύνθετα βιολογικά δείγματα. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος βασίζεται κυρίως στην ικανότητα της αντιοξειδωτικής ουσίας να δώσει ηλεκτρόνια ή άτομα υδρογόνου (Prior *et al.*, 2005). Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις σπουδαιότερες και συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας:

- Μέθοδος DPPH: Στηρίζεται στην αλληλεπίδραση μια σταθερής χημικής ρίζας, DPPH, με μια αντιοξειδωτική ουσία, που έχει σαν αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό και τη μείωση της απορρόφησης της ρίζας (Williams et al., 2004; Molyneux, 2004).
- Μέθοδος ABTS : Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της μεθόδου, αλλά βασίζεται στην ίδια αρχή με την προηγούμενη μέθοδο με τη διαφορά ότι προηγείται η ενεργοποίηση της δραστικής ρίζας ABTS (Miller, 1996).
- Μέθοδος FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power - Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου*): Στηρίζεται στην αναγωγή ενός συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου από το αντιοξειδωτικό προς ένα προϊόν με έντονο μπλε χρώμα. Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμάται από την αύξηση της απορρόφησης (Benzie & Strain, 1996).
- Μέθοδος ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay- Ικανότητα Απορροφητικότητας Ριζών Οξυγόνου*): Η μέθοδος αυτή μετά την αναγέννηση ελευθέρων ριζών και την προσθήκη αντιοξειδωτικών παρακολουθεί την επιβράδυνση ή αναστολή της οξείδωσης του υποστρώματος. Βασίζεται στην αναστολή παραγωγής των ελευθέρων ριζών παρουσία των αντιοξειδωτικών και έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση του φθορισμού ορισμένων ουσιών (πχ. φυκοερυθρίνες) (Cao & Prior, 1999; Huang et al., 2002).
- Μέθοδος TRAP (*Total Radical Antioxidant Potential - Συνολικό Δυναμικό Παγίδευσης Ριζών Υπεροξειδίου*): Βασίζεται σε μία αντίδραση ριζών περοξυλίου, η οποία αναστέλλεται με την προσθήκη αντιοξειδωτικών. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται είτε με την μέτρηση της κατανάλωσης οξυγόνου, είτε μέσω της μείωσης φθορισμού όταν ουσίες όπως η φυκοερυθρίνη, συμμετέχουν στην αντίδραση (Wayner et al, 1985, Shahin et al., 2007).
- Μέθοδος PCL (*Photochemiluminescence - Χημειοφωταύγεια*): Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της λουμινόλης και συγγενών ενώσεων να εκπέμπουν φως υπό τη ροή των ελευθέρων ριζών. Η ένταση του παραγόμενου φωτός κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων της χημειοφωταύγειας είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης σουπεροξειδίου. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών προκαλεί μία πτώση της έντασης (Poron & Lewin, 1999).
- Μέθοδος TOSC (*Total Oxidant Scavenging Capacity*): Η μέθοδος βασίζεται σε μια αντίδραση οξείδωσης, η οποία αναστέλλεται παρουσία αντιοξειδωτικών με αποτέλεσμα τη μείωση των προϊόντων (αιθυλένιο) της αντίδρασης. Η μείωση αυτή, μπορεί να προσδιοριστεί με αέρια χρωματογραφία (Winston et al., 1998).



Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης πρέπει να γίνεται χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δύο ή περισσότερες μεθόδους και στο τέλος πρέπει να συγκρίνονται οι γενικές τάσεις των τιμών της αντιοξειδωτικής δράσης για το κάθε δείγμα (Frankel et al, 2000).

#### **1.6. Οι βιολογικές - αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αρωματικών φυτών**

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει δείξει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες. Ο κύριος λόγος είναι η αναγνώριση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των πολυφαινόλων και του πιθανού ρόλου τους στην παρεμπόδιση πολλών ασθενειών, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Τα αρωματικά φυτά βρίσκουν εφαρμογή σε πολλές περιπτώσεις, όπως στην παρασκευή φαρμάκων, στη διατροφή, στην κοσμητολογία κ.ά. Τα βότανα αποτελούσαν από παλιά τη βάση για την αντιμετώπιση όλων των ασθενειών. Αυτό έπαψε να ισχύει με την παρασκευή συνθετικών φαρμάκων αλλά ακόμα και σήμερα τα βότανα αποτελούν συστατικά φαρμάκων σε ποσοστό 40% (Zheng & Wang, 2001).

Τα συστατικά με αντιοξειδωτική δυνατότητα, που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φυτά φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση διάφορων ασθενειών (Hu & Willett, 2001). Τα βότανα, περιέχουν υψηλά ποσά βιοδραστικών συστατικών τα οποία μέσω της διατροφής είναι ικανά να απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες και ενδέχεται να έχουν ευεργετική δράση για την υγεία. (Madsen & Bertelsen (1995). Παρόλο που είναι γνωστό, ότι μια μεγάλη ποικιλία βοτάνων διαθέτει φαινολικά συστατικά, τα δεδομένα, όσον αφορά τη σύνθεσή τους δεν είναι απολύτως ξεκάθαρα και επαρκή (Kahkonen et al, 1999). Τα βότανα, φαίνεται ότι κατέχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Lee et al, 2004). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από τους ερευνητές επικεντρώνεται κυρίως σε φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* (Fecka & Turek, 2008), με πρώτες επιλογές το δενδρολίβανο, το φασκόμηλο (Erkan et al, 2008) τη ρίγανη, τη μέντα και το θυμάρι (Zandi & Ahmadi, 2000), διότι τα συστατικά των βοτάνων που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση (Craig, 1999).

### 1.6.1. Η Οικογένεια των Χειλανθών *Lamiaceae*

Η οικογένεια των Χειλανθών (*Labiatae* ή *Lamiaceae*) περιλαμβάνει περισσότερα από 240 γένη και 3500 είδη παγκοσμίως. Φύονται κυρίως στη ζώνη της Μεσογείου, αλλά κάποιες ομάδες τις συναντώνται στην Αυστραλία, στη νοτιοδυτική Ασία και στη νότια Αμερική. Περιλαμβάνει πολλά γνωστά φυτά, βότανα, θάμνους και δέντρα, περισσότερα από τα οποία είναι αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, όπως το φασκόμηλο (*Salvia*), το θυμάρι (*Thymus*), η μέντα (*Mentha*), η ρίγανη (*Origanum*), το δεντρολίβανο (*Rosmarinus*), η λεβάντα (*Lavandula*), ο βασιλικός (*Ocimum*) και το τσάι του βουνού (*Sideritis*) (Kokkini et al, 2003).

Τα αιθέρια έλαια, που εκκρίνονται από τους αδένες των φύλλων και των βλαστών, ορισμένων ειδών της οικογένειας *Labiatae*, εκχυλίζονται για πληθώρα χρήσεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η μινθόλη (menthol), που είναι ένα από τα σπουδαιότερα αιθέρια έλαια και χρησιμοποιείται στην Ιατρική, αλλά και ως καρύκευμα. Η θυμόλη (thymol), που βρίσκει εφαρμογές στην Ιατρική, είναι πολύ ισχυρό αντισηπτικό. Το συνολικό περιεχόμενο σε αιθέρια έλαια, διαφέρει σημαντικά ποιοτικά αλλά και ποσοτικά ακόμα και αν αναφερόμαστε στο ίδιο είδος, ανάλογα με την εποχή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και γενετικές διαφορές. Επίσης, ο χρόνος συγκομιδής θεωρείται σημαντικός, για το συνολικό περιεχόμενο σε αιθέρια έλαια αλλά και στην αναλογία βιοδραστικών συστατικών. Έτσι για παράδειγμα το φασκόμηλο περιέχει τη διπλάσια ποσότητα σε αιθέρια έλαια τέλος καλοκαιριού σε σχέση με την αρχή της άνοιξης, και με σημαντική διαφορά στα φαινορικά συστατικά (Kokkini et al, 2003).

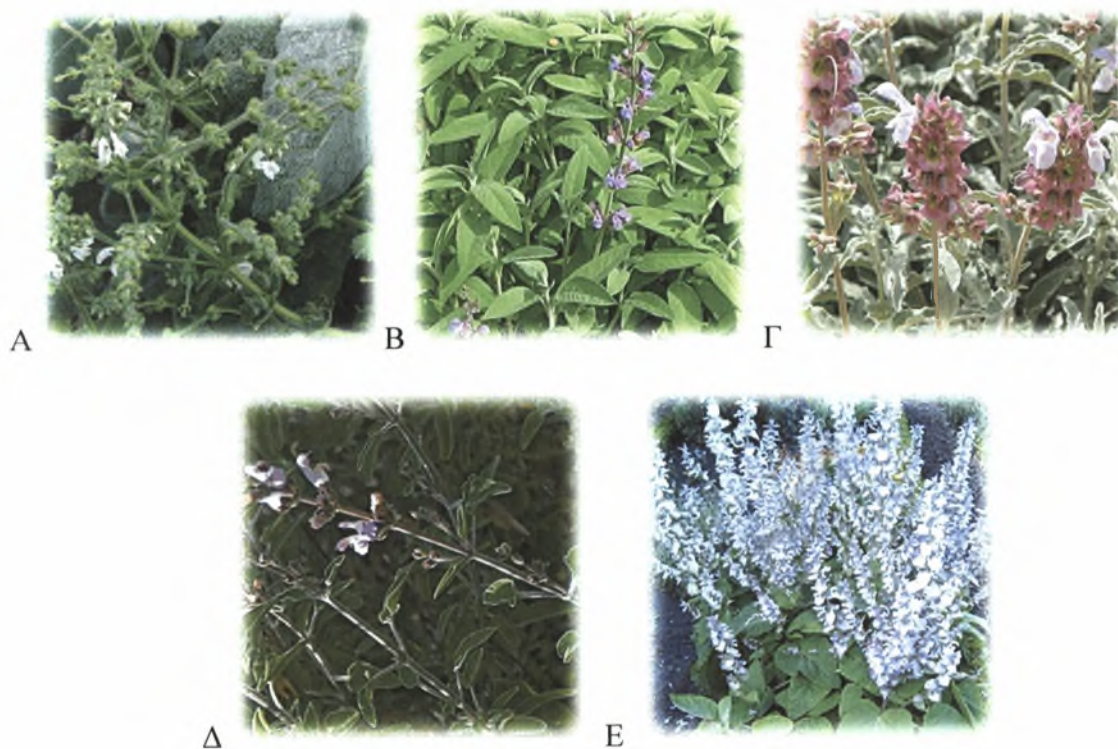


Εικόνα 12 Είδη της οικογένειας *Labiatae* αποτελούν πρώτη ύλη για την παρασκευή φαρμάκων

### 1.6.1.1. Φασκόμηλο (*Salvia spp.*)

#### Βοτανικά στοιχεία

Τα φυτά του γένους *Salvia* (φασκόμηλο) ανήκουν στην οικογένεια *Labiatae* και είναι πολυετείς αειθαλείς θάμνοι. Σε νεαρές ηλικίες είναι γκρίζα και χνουδωτά. Έχουν γκριζοπράσινα μαλακά φύλλα, ενώ μωβ-μπλε λουλούδια εμφανίζονται στα άνθη κατά το καλοκαίρι. Το φασκόμηλο αναπτύσσεται σε ηλιόλουστες περιοχές με αλκαλικά εδάφη. Υπάρχουν περίπου πεντακόσια είδη του γένους *Salvia*, αλλά λίγα είναι ευρέως γνωστά, με σημαντικότερα το *S. officinalis*, το *S. fruticosa*, το *S. azurea*, το *S. sclarea*, το *S. viridis*, το *S. horminoides*, *S. divinorum*, το *S. rutilans* και το *S. promifera* (Εικόνα 13). Το πιο γνωστό είδος, *Salvia officinalis*, καλλιεργείται στη Γιουγκοσλαβία, στην Αλβανία, στην Τουρκία, στην Ιταλία, στην Ελλάδα, στις Η.Π.Α και στην Ισπανία (Skoula et.al, 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι στη χώρα μας παρουσιάζει περιορισμένη εξάπλωση ως αυτοφυές (συναντάται μόνο στην περιοχή της Ηπείρου). Το *S. fruticosa* είναι γνωστό είναι ενδημικό φυτό των μεσογειακών και μεσανατολικών χωρών και αποτελεί το κοινότερο είδος του γένους στην Ελλάδα. Φύεται σε περιοχές χαμηλών υψομέτρων (κάτω των 300 m). Το *S. promifera* είναι ενδημικό της Ν. Ελλάδας ενώ το *S. Sclarea*, στην Ελλάδα, απαντάται ως αυτοφυές στην Ήπειρο και στη Μακεδονία (Simon, 1984).



Εικόνα 13 Α *Salvia argentea*, Β *Salvia officinalis*, Γ *Salvia pomifera* Δ *Salvia fruticosa* Ε *Salvia sclarea*

## Βιοδραστικά στοιχεία και βιολογικές ιδιότητες

Το φασκόμηλο χρησιμοποιείται από πολύ παλιά για την αντιμετώπιση κρυωμάτων, διάρροιας, εντερίτιδας και πονόλαιμου. Η χαρακτηριστική ουσία που περιέχεται στο αιθέριο έλαιο που παράγουν τα φυτά του *Salvia officinalis* είναι η α- και η β- θουγιόνη. Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται στο είδος αυτό είναι το β-πινένιο, διτερπένια, τριτερπένια, φλαβονοειδή, συστατικά φαινολικών οξέων και φαινολικοί γλυκοζίτες (Miura et al., 2000). Στην περίπτωση του *S. fruticosa* τα κυριότερα χαρακτηριστικά του αιθέριου ελαίου είναι η 1,8 κινεόλη, το β-μυρκενίο, το α και β-πινένιο, η α και β-θουγιόνη και η καμφορά (Skoula et al., 2000). Σύμφωνα με μελέτες το φασκόμηλο περιέχει φαινολικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση (Yinrong et al., 1999). Η αντιοξειδωτική του δράση, αποδόθηκε σε βιοδραστικά στοιχεία, όπως τερπενοειδή, φλαβονοειδή, και φαινολικά οξέα (Yinrong et al., 2000; Thorsen & Hildenbrandt, 2003). Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί παράγοντες, όπως τα τριτερπένια ολεανολικό και ουρσολικό οξύ ή το διτερπένιο καρνοσολικό οξύ, τα οποία έχουν αντιφλεγμονώδης δράση (Baricevic et al., 2001).

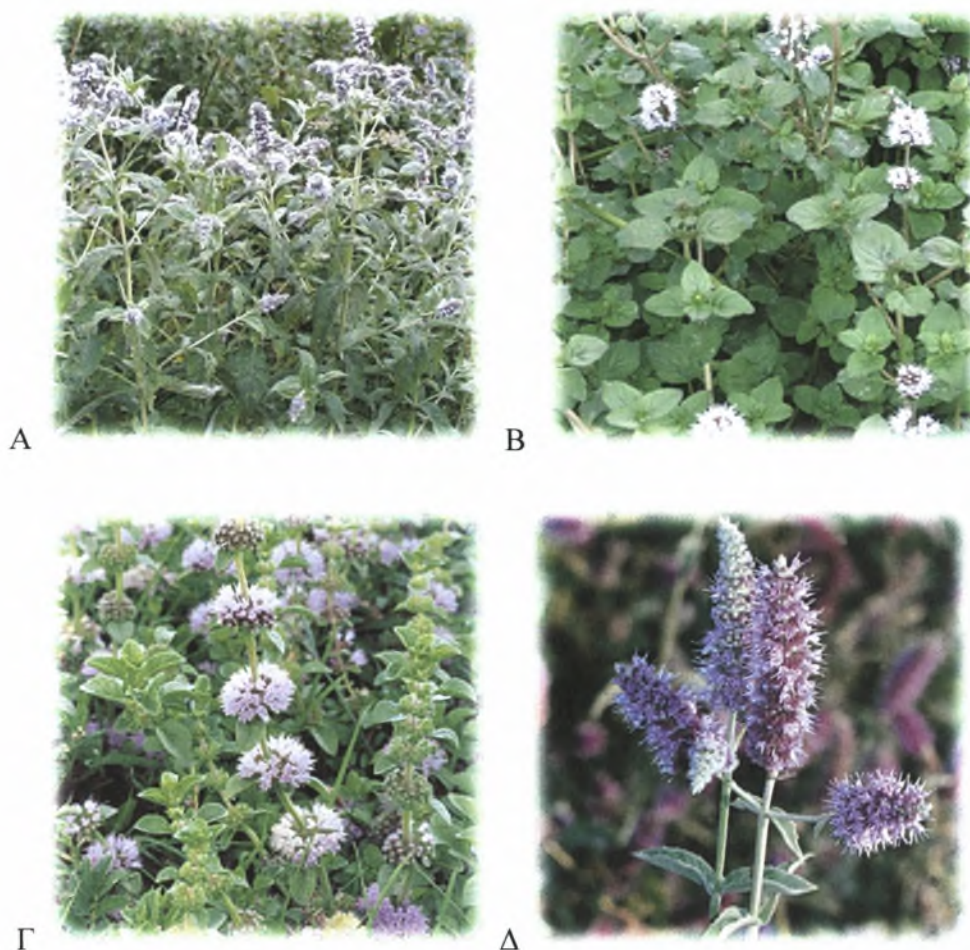
### 1.6.1.2. Μέντα (*Mentha spp.*)

#### Βοτανικά στοιχεία

Η Μέντα ανήκει στην οικογένεια *Labiatae* (Χειλανθή). Τα φυτά αυτά ευδοκιμούν στα θερμά και ξηρά κλίματα και φέρουν αδενώδεις τρίχες στα φύλλα και στους βλαστούς. Οι τρίχες αυτές εκκρίνουν αιθέρια έλαια. Οι βλαστοί των φυτών αυτών είναι τετράγωνοι (εκτός από τα φυτά που έρπουν) και φέρουν φύλλα αντίθετα, σταυρωτά ή κατά σπονδύλους, συνήθως απλά, χωρίς παράφυλλα. Όλα τα είδη του γένους *Mentha*, άγρια και καλλιεργούμενα αναδίδουν ένα χαρακτηριστικό, έντονο άρωμα, που οφείλεται σε ένα από τα κύρια αιθέρια έλαια του φυτού, που υπάρχει στα φύλλα και στα στελέχη και περιέχει μινθόλη (Kokkini, 2003).

Το γένος *Mentha* είναι ιθαγενές της κεντρικής Ευρώπης, λόγω του μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει, τώρα πλέον έχει προσαρμοστεί και καλλιεργείται ευρύτατα και σε άλλες περιοχές του κόσμου όπως στις Η.Π.Α., στον Καναδά, στην Ασία και στην Β. Αφρική. Στην Ελλάδα, λόγω της μεγάλης γεωκλιματικής ποικιλομορφίας φύεται σε όλη την έκταση της χώρας με αντιπροσωπευτικά είδη τη *Mentha pulegium*, τη *Mentha longifolia*, τη *Mentha spicata*, τη *Mentha suaveolens* και τη *Mentha aquatica*. Γνωστό επίσης είδος είναι η *Mentha Piperita* συγγενές με το δυόσμο (*Mentha Viridis*) και το φλισκούνη (*Mentha Pylegium*) (Εικόνα 14).





Εικόνα 14 Α *Mentha longifolia* Β *Mentha aquatica* Γ *Mentha pulegium* Δ *Mentha microphylla*

### Βιοδραστικά στοιχεία και βιολογικές ιδιότητες

Η μινθόλη αποτελεί το πιο άφθονο και το σημαντικότερο συστατικό της μέντας χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς και διατροφικούς σκοπούς. Η μινθόλη θεωρείται ότι παρουσιάζει τις παρακάτω δράσεις, αντιμικροβιακή, τονωτική, αναλγητική, καρδιοτονωτική, αντιβηχική και αντιασθματική, ηρεμιστική για το στομάχι αλλά και κατά των ιλίγγων, της ταχυκαρδίας και των νευρικών διαταραχών (Zheng, 2001). Τα διάφορα είδη της μέντας, παρουσιάζουν ένα εξαιρετικά μεγάλο χημικό πολυμορφισμό (Kokkini, 2000). Σύμφωνα με μελέτες, τα αιθέρια έλαια από πολλά είδη μέντας, όπως *M. spicata*, *M. piperita*, *M. arvensis*, *M. rotundifolia*, *M. suaveolens* and *M. Pulegium* έχουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Daferera et al., 2003; Economou, et al., 1991; Kaur & Kapoor, 2002).

### 1.6.1.3. Τσάι του βουνού (*Sideritis spp*)

#### Βοτανικά στοιχεία

Τα φυτά του γένους *Sideritis* είναι μέλη της οικογένειας Χειλανθών (*Labiatae*) και είναι δικοτυλήδονα. Έχουν ποώδη ανάπτυξη, μονοετή ή πολυετή κύκλο ζωής και ο βλαστός τους είναι απλός ή διακλαδισμένος, αποξυλωμένος στη βάση του, καλυπτόμενος με χνούδι (Εικόνα ). Τα φύλλα, σε σχήμα λόγχης, είναι οδοντωτά ή ακέραια και τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, λευκά ή κίτρινα, σε ταξιανθία στάχτους.

Το γένος *Sideritis* της οικογένειας *Labiatae* περιλαμβάνει περίπου 140 γνωστά είδη. Τα δέκα από αυτά είναι ετήσια και τα υπόλοιπα, πολυετή και ανήκει στα αρωματικά φυτά, λόγω της περιεκτικότητας τους σε αιθέρια έλαια (Baden, 1991). Στην Ελλάδα είναι γνωστό σαν τσάι του βουνού και ανήκει στα αυτοφυή είδη που απειλούνται με εξαφάνιση (Koutsos & Chantzopoulou, 2004). Η κύρια ζώνη ανάπτυξης των ειδών του είναι οι παραμεσόγειες περιοχές και κυρίως η Ισπανία, οι Κανάριοι νήσοι, η Ιταλία, η Ελλάδα, η Γαλλία, τα παράλια της Βορείου Αφρικής, η Κύπρος και η Τουρκία. Ως κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι όλα τα είδη αναπτύσσονται ως πόες και σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 1.000 μέτρων. Όπως και τα περισσότερα είδη του γένους *Sideritis*, επιβιώνουν σε απόκρημνες βραχώδεις περιοχές και είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και στις χαμηλές θερμοκρασίες. Τα ενδημικά είδη της Ελλάδας είναι: (1) το *Sideritis athoa* (Αθως), (2) το *Sideritis scardica* (Όλυμπος), (3) το *Sideritis raeseri* (Παρνασσός), (4) το *Sideritis clandestina* (Ταύγετος), (5) το *Sideritis euboica* (Εύβοια) και (6) το *Sideritis syriaca* (Κρήτη) (Papanicolaou & Kokkini 1984). (Εικόνα 15)



Εικόνα 15 *Sideritis raeseri* subsp. *raeseri*

## Βιοδραστικά στοιχεία και βιολογικές ιδιότητες

Τα εκχυλίσματα και τα περισσότερα αιθέρια έλαια του γένους *Sideritis* είναι βιοδραστικά, κυρίως λόγω της περιεκτικότητας τους σε φλαβονοειδή και τερπενοειδή (Papanicolaou & Kokkini 1984; Villar et al. 1984; Samaras et al. 2002). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι έχουν αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση (Menghini et al. 2005). Η φαινολική σύσταση 27 ειδών του γένους *Sideritis*, μελετήθηκε από τους Tunalier et al. (2004). Από την ανάλυση αυτή ταυτοποιήθηκαν τρεις κατηγορίες φαινολικών ομάδων, βενζοϊκά οξέα, υδροξυκιναμμωμικά οξέα και φλαβονοειδή. Εννέα διαφορετικές δομές φλαβονών του τύπου 5,8-dihydroxy-flavone- 7-o-allosylglucosides, απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του υποείδους *Sideritis raeseri subsp. raeseri* (Gabrieli et al. (2005).

Από τα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί στα είδη του *Sideritis* τα περισσότερα ανήκουν στις φλαβόνες τύπου απιγενίνης ή λουτεολίνης (Tomas & Ferres, 1980). Μεταξύ των φαινολικών οξέων, σε μεγαλύτερη αναλογία βρέθηκε το υδροξυκιναμικό, το οποίο θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό. Σε μελέτη πάνω στο είδος *S. cretica* εκτός από το 4-υδροξυ κιναμικό οξύ σε μεγάλη ποσότητα παρελήφθηκε το p-υδροξυ βενζοϊκό και το ομοβανιλλικό. Επιπλέον, διαχωρίστηκαν τα: τρανς-κινναμικό, βανιλλικό, συριγικό και φερουλικό (Fiamegos et al., 2004). Όσον αφορά την αντιφλεγμονώδη ιδιότητά τους βρέθηκαν τρία παράγωγα του καφεϊκού οξέος και ένα του φερουλικού, ως τις δραστικές ουσίες κατά του οιδήματος. Έτσι λόγω του φαινολικού περιεχομένου, το τσάι του βουνού μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό, έχοντας ευεργετικές συνέπειες στον οργανισμό (Armata et al, 2008).

### 1.6.1.4. Ρόδι (*Punica granatum*)

#### Βοτανικά στοιχεία

Το ρόδι ή αλλιώς *Punica granatum* είναι φυλλοβόλος θάμνος ή δένδρο και ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*. Αναπτύσσεται σε ηλιόλουστες περιοχές και σχετικά ξηρά εδάφη, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό και σπάνια προσβάλλεται από παράσιτα. Συνήθως φέρει πολλαπλά στελέχη και φτάνει τα 3-5μέτρα ύψος. Τα φύλλα είναι λεία και έχουν μήκος οκτώ εκατοστά. Οι ροδιές έχουν πορτοκαλοκίτρινα άνθη σε κωνοειδές σχήμα με πτυχωτά πέταλα με μήκος πέντε εκατοστά, είναι συχνά διπλά και ανθίζουν για μεγάλο διάστημα το καλοκαίρι. Οι καρποί της ροδιάς είναι λείοι, σφαιρικοί με διάμετρο 5-10 εκατοστά και αποτελούνται από τους σπόρους (3%), το χυμό και την μεμβράνη που τους περιβάλλει (20%) καθώς και το περικάρπιο με το εσωτερικό μεμβρανικό δίκτυο. Το ρόδι κατάγεται



από τη μέση ανατολή και σήμερα υπάρχουν πολλές ποικιλίες και καλλιεργήσιμες εκτάσεις στην Μεσόγειο, Κίνα, Ινδία, Νότια και δυτική Αμερική (Levin, 1994).



Εικόνα 16 *Punica granatum*

### Βιοδραστικά στοιχεία και βιολογικές ιδιότητες

Οι περισσότερες μελέτες, που αφορούν τη χημική ανάλυση των ροδιών έχουν εστιάσει στον χυμό, το περικάρπιο και το έλαιο των σπόρων. Ο χυμός περιέχει μεγάλες ποσότητες ταννινών (γαλλικό οξύ και κηκιδικό οξύ), ανθοκυανίνες (κυανούχο άλας, δελφινίδες, πελαργονιδίνες) και φαινολικά οξέα (κηκιδικό οξύ, καφεϊκό οξύ και χλωρογενικό οξύ). Το περικάρπιο είναι επίσης πλούσιο σε υδρολυτικές ταννίνες, καθώς και φλαβονοειδή (λουτεολίνη, κερκετίνη και καμπφερόλη). Το έλαιο των σπόρων περιέχει ένα σημαντικό συστατικό, στο οποίο έχει αποδοθεί μέρος των ιδιοτήτων του ροδιού, το πουνικικό οξύ. Σε κλινικές έρευνες φαίνεται ότι ο συνδυασμός των βιοδραστικών συστατικών που περιέχει το ρόδι και όχι τα μεμονωμένα συστατικά, είναι υπεύθυνος για τις σημαντικές ιδιότητες που παρουσιάζει (Lansky et Newman, 2007).

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν, ότι το ρόδι έχει σημαντικές προληπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Οι φυτοχημικές ουσίες που περιέχονται στο ρόδι έχουν ευεργετική επίδραση, στην θεραπεία ανεπάρκειας του ανοσοποιητικού (AIDS) (Lee and Watson, 1998), σε θεραπείες ορμονικής υποκατάστασης (Lansky, 2000), σε αλλεργικά σύνδρομα (Watanabe and Hatakoshi, 2002) κ.α. Το ρόδι φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική και χημειοπροστατευτική δράση. Όπως διαπιστώθηκε ο χυμός ροδιού μειώνει τον κίνδυνο για καρδιαγγειακές νόσους, επιδρώντας στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και ιδιαίτερα της LDL, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης αθηρωμάτωσης (Shiraishi et al., 2002; Aviram and Dornfeld, 2003). Μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει, ότι ο χυμός ροδιού αποτρέπει ή επιβραδύνει την ανάπτυξη όγκων σε διάφορες μορφές καρκίνου και συμβάλλει στην επιδιόρθωση της βλάβης στο DNA (Syed et al., 2007, Koyama et al. 2010).



### 1.7. Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και της χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων ενδημικών ποικιλιών φασκόμηλου, μέντας, τσαγιού (του βουνού) και ροδιού. Στη βιβλιογραφία υπάρχει εκτεταμένη αναφορά για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αρωματικών φυτών, αποδιδόμενες στο περιεχόμενο τους σε πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση των ελευθέρων ριζών. Για να μελετηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Και οι δύο μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των ουσιών να εξουδετερώνουν σταθερές χημικές ρίζες, που θεωρούνται ανάλογα των ελευθέρων ριζών. Η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των εκχυλισμάτων με τις χημικές δραστικές ρίζες σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες είναι άφθονα μικροστοιχεία στη δίαιτα μας, δυνητικά είναι ακόμη ένα στοιχείο ότι μπορούν να δράσουν χημειοπροστατευτικά μέσω της διατροφής.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma- Germany)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Υπεροξείδιο του Υδρογόνου) (Merck- Germany)
- HRP (Περοξειδάση) (Sigma- Germany)
- Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH) (Merck- Germany)

2.1.2. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα, που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από αρωματικά φυτά (*Mentha spp. Salvia spp. Sideritis spp. Punica spp.*) της περιοχής του Κισσάβου. Τα εκχυλίσματα ήταν τριών τύπων, υδατικά, αιθανολικά και μεθανολικά και εξετάστηκαν τα παρακάτω είδη των προαναφερθέντων φυτών (Πίνακες 4, 5, 6):

Πίνακας 4 Εκχυλίσματα Φασκόμηλου

Κωδ. Εκχυλίσματος	Φυτό	Τύπος
029	<i>Salvia argentea</i>	Μεθανολικό
030	<i>Salvia argentea</i>	Υδατικό
023	<i>Salvia fruticosa</i>	Μεθανολικό
024	<i>Salvia fruticosa</i>	Υδατικό
020	<i>Salvia officinallis</i>	Μεθανολικό
021	<i>Salvia officinallis</i>	Υδατικό
035	<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	Μεθανολικό
036	<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	Υδατικό
032	<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	Μεθανολικό
033	<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	Υδατικό
026	<i>Salvia sclarea</i>	Μεθανολικό
027	<i>Salvia sclarea</i>	Υδατικό

**Πίνακας 5** Εκχυλίσματα Μέντας

Κωδικός Εκχυλίσματος	Φυτό	Τύπος
011	<i>Mentha aquatica</i>	Μεθανολικό
012	<i>Mentha aquatica</i>	Υδατικό
014	<i>Mentha longifolia</i>	Μεθανολικό
015	<i>Mentha longifolia</i>	Υδατικό
006	<i>Mentha microphylla 1</i>	Αιθανολικό
008	<i>Mentha microphylla 2</i>	Αιθανολικό
007	<i>Mentha microphylla 1</i>	Υδατικό
009	<i>Mentha microphylla 2</i>	Υδατικό
017	<i>Mentha pulegium</i>	Μεθανολικό
018	<i>Mentha pulegium</i>	Υδατικό

**Πίνακας 6** Εκχυλίσματα ροδιού και τσαγιού

Κωδικός Εκχυλίσματος	Φυτό	Τύπος
001	<i>Punica granatum</i>	Υδατικό
003	<i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	Αιθανολικό
004	<i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	Υδατικό
040	<i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	Μεθανολικό
041	<i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	Υδατικό

### 2.1.3. Διαδικασία εκχύλισης

Τα υπέργεια τμήματα των φυτών, αποξηραθήκαν και κονιορτοποιήθηκαν σε ειδικό μύλο. Ποσότητα των τμημάτων φυτών χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 v/v) και νερό (2/1 v/v), αιθανόλη (2/1 v/v) σε ειδική συσκευή αυτόματης εκχύλισης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη επαναλήφθηκε τρεις φορές και κάθε εκχύλιση διαρκούσε 48 h. Στην συνέχεια ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων υπό κενό. Στην συνέχεια η ξηρή ποσότητα των εκχυλισμάτων διαλύθηκε σε νερό για την πραγματοποίηση των *in vitro* δοκιμών.

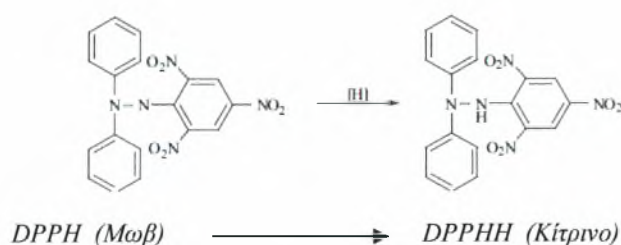
## 2.2. Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι (DPPH & ABTS), οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση σταθερών χημικών ριζών από αντιοξειδωτικές ενώσεις. Οι μέθοδοι *in vitro* είναι κατά βάση ποιοτικές και χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύσουν αν το δεδομένο συστατικό είναι αντιοξειδωτικό ή όχι. Όμως με τον προσδιορισμό του IC<sub>50</sub> μπορούν να ποσοτικοποιήσουν την αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον είναι απλές, χρωματομετρικές (Kaur et al, 2006; Prior et al., 2005; Molyneux, 2004).

### 2.2.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>

#### 2.2.1.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand- Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH<sup>•</sup> μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (17). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 17 Η αναγωγή του DPPH σε DPPH:H

2.2.1.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH<sup>•</sup> την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH<sup>•</sup>) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 20, 50 μg/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 8). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα της ρίζας DPPH<sup>•</sup> σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Πίνακας 7 Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
DPPH <sup>•</sup>	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 8 Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

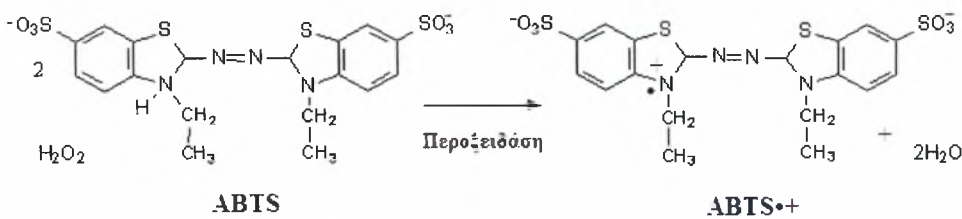
	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml



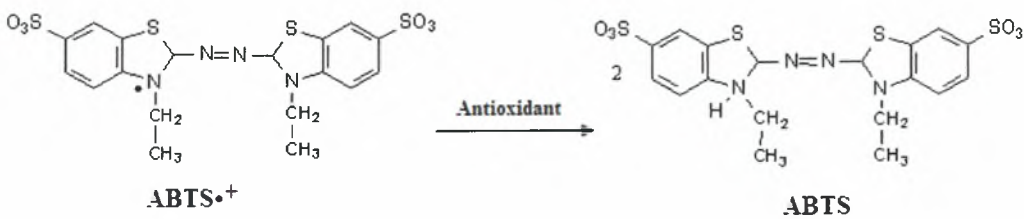
2.2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

2.2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από το Miller (Miller & Rice-Evans, 1993), βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Το ABTS 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση του (ABTS) και την δημιουργία μιας δραστικής ρίζας, του κατιόντος ABTS<sup>•+</sup> (Εικόνα 18). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 19) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999)



Εικόνα 16 Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



Εικόνα 19 Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

### 2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 20, 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

**Διάλυμα ABTS (1mM):** Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500  $\mu\text{l}$ ) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ):** Για τελική συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}_2$  30  $\mu\text{M}$  σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50  $\mu\text{l}$ ) φτιάχνουμε διάλυμα 600  $\mu\text{M}$ . Από το stock διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% 8,8 M αραιώνουμε με  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600  $\mu\text{M}$ .

**Διάλυμα HRP (6  $\mu\text{M}$ ):** Για τελική συγκέντρωση HRP σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50  $\mu\text{l}$ ) φτιάχνουμε διάλυμα HRP 120  $\mu\text{M}$ . Από stock διάλυμα HRP 108 mM αραιώνουμε με  $\text{H}_2\text{O}$  ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 120  $\mu\text{M}$ .

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000  $\mu\text{l}$ , στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου  $\text{H}_2\text{O}_2$  και το ένζυμο περοξειδάση. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 9). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 10).

Πίνακας 9 Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
<b>ABTS</b>	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>HRP</b>	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>V τελ</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1 mL	1 mL
<b>Επώαση 45 min</b>							
<b>Εκχύλισμα</b>	-	-	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

Πίνακας 10 Έλεγχος απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλης

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 $\mu$ L	450 $\mu$ L	450 $\mu$ L	450 $\mu$ L	450 $\mu$ L	450 $\mu$ L
<b>ABTS</b>	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>V τελ</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1 mL	1 mL
<b>Εκχύλισμα</b>	-	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

### 2.2.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των δύο μεθόδων

**DPPH:** Το DPPH είναι μία σταθερή διαθέσιμη στο εμπόριο οργανική αζωτο-ρίζα και θεωρείται εύκολη και ακριβής για εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών εκχυλισμάτων (Sanchez-Moreno, 2002). Δεν είναι κατάλληλη μέθοδος για την αντιοξειδωτική μέτρηση του πλάσματος, αφού οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται παρουσία μεθανόλης (Sanchez-Mareno, 2002). Χαρακτηρίζεται ως απλή και γρήγορη μέθοδο με μόνη απαίτηση UV φωτόμετρο στον εργαστηριακό εξοπλισμό, μειονέκτημα όμως αποτελεί, όταν η απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος εμπλέκεται, καλύπτει την απορρόφηση του DPPH, όπως συμβαίνει με τα καροτενοειδή (Noruma, 1997). Όπως έχει αναφερθεί, αρχικά η ρίζα DPPH<sup>•</sup> θεωρούνταν, ότι μπορεί να αδρανοποιηθεί μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) αλλά πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι αυτό συμβαίνει σε πρώτη φάση μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου

(single electron transfer, SET) και ακολουθεί η προσθήκη ατόμων υδρογόνου (Foti et al, 2004). Ο παραπάνω μηχανισμός σε συνδυασμό με την πιθανή παρουσία οξέων ή βάσεων στο διάλυμα, μπορεί να επηρεάσουν την ιοντική ισορροπία των φαινολών και να οδηγήσουν σε ανακριβή αποτελέσματα εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Foti et al, 2004; Prior et al, 2005). Ένα ακόμη μειονέκτημα της μεθόδου, είναι η στερεοσκοπική διαμόρφωση της ρίζας, που δίνει καλύτερη πρόσβαση και πλεονέκτημα σε δείγματα αποτελούμενες από μικρότερα μόρια, με αποτέλεσμα να δίνουν καλύτερα αποτελέσματα δράσης (Prior et al, 2005). Τέλος το pH δεν επηρεάζει την αντίδραση, αφού για διαλύτης χρησιμοποιείται η μεθανόλη. Συγκριτικά με την μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, η μέθοδος αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> θεωρείται πιο κατάλληλη για δείγματα που περιέχουν λιπόφιλα αντιοξειδωτικά και αυτά που έχουν υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο (Ozgen et al, 2006).

**ABTS:** Όταν το ABTS ενεργοποιηθεί ενζυμικά (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> & HRP) είναι μία πολύ σταθερή ρίζα, γεγονός μεγάλης σημασίας για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και επαναληψιμότητα (MacDonald et al 2006). Η ρίζα δεν υπάρχει στα βιολογικά συστήματα και δεν έχει ομοιότητες με ρίζες που υπάρχουν σε αυτά (MacDonald et al 2006). Όταν η ρίζα ABTS ενεργοποιείται ενζυμικά, η αντίδραση γίνεται γρήγορη και μπορεί να δουλέψει σε μεγάλο εύρος pH, αλλά προτιμάται το όξινο περιβάλλον. Όπως έχουν δείξει μελέτες το pH μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην ισορροπία της αντίδρασης (Cano et al, 1998) αλλά δεν αποτελεί κανένα πρόβλημα όταν κυμαίνεται από 3,0-6,5. Το ABTS είναι διαλυτό τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες και δεν επηρεάζεται από το σθένος των ιόντων με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση υδρόφιλων αλλά λιπόφιλων συστατικών, με προτιμότερα τα πρώτα (Awika et al, 2003). Ακόμη, ένα συστατικό για να μπορέσει να αντιδράσει και να εξουδετερώσει το ABTS θα πρέπει να έχει χαμηλότερο δυναμικό, παρόλα αυτά φαινολικά συστατικά με χαμηλό δυναμικό, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ABTS.

Γενικά λόγω των διαφορών μεθόδων εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας, συνιστάται τα δείγματα να ελέγχονται, με τουλάχιστον δύο μεθόδους η επιλογή των οποίων θα γίνεται ανάλογα με το αναμενόμενο αντιοξειδωτικό αλλά και την προέλευση των ουσιών (Schlesier, et al., 2002). Η μέθοδος αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> θεωρείται μία σταθερή μέθοδος και καλή επιλογή για συνδυασμό με τη μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> και δίνει ένα επιπλέον πλεονέκτημα σε περίπτωση αντιοξειδωτικών ουσιών, πιο διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες.

#### 2.2.4. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Και για τις δύο μεθόδους, η αντιοξειδωτική ικανότητα των εξεταζόμενων ουσιών, υπολογίζεται ως το ποσοστό αναστολής της δράσης των ριζών και εκφράζεται σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH ή ABTS αντίστοιχα, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ εξουδετέρωση των ριζών} = [(A_0 - A_\delta)/A_0] \times 100$$

όπου:

$A_0$ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

$A_\delta$ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Επιπλέον, για το κάθε εκχύλισμα και για κάθε μέθοδο, υπολογίστηκε το  $IC_{50}$ , η συγκέντρωση δηλαδή του κάθε εκχυλίσματος, που έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει κατά 50% τη ρίζας (DPPH<sup>•</sup> ή ABTS<sup>•+</sup>). Όσο μικρότερη είναι η τιμή  $IC_{50}$  τόσο πιο ισχυρή είναι η δράση του δείγματος.

#### 2.2.5. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογιζόταν η μέση τιμή και τυπική απόκλιση των τιμών της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων στα 517 nm και 730 nm για τις ρίζες DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup>. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 13.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Dunnett. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για  $p < 0,05$ . Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

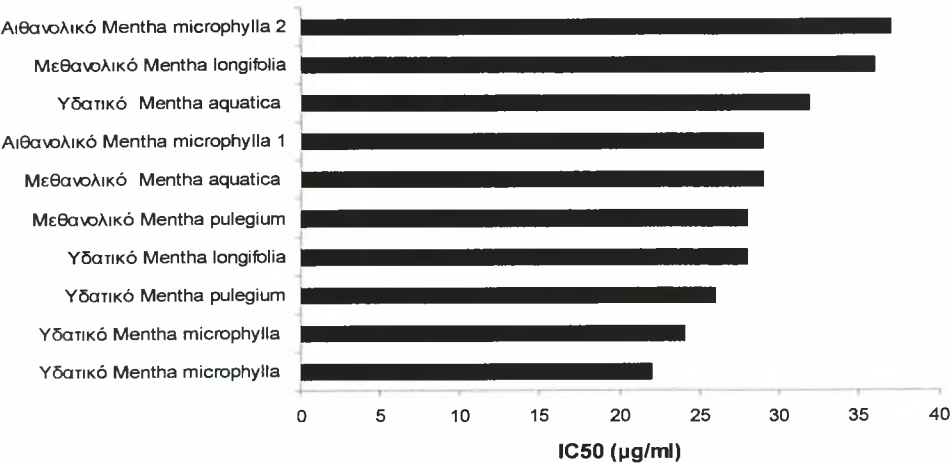
3.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH

3.1.1. Εκχυλίσματα μέντας

Συνολικά μελετήθηκαν 10 εκχυλίσματα μέντας. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 22 µg/ml έως 37µg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha microphylla 1*, ενώ το πιο ασθενές εκχύλισμα ήταν το αιθανολικό, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha microphylla 2* με τιμές IC<sub>50</sub> 22µg/ml και 37µg/ml, αντίστοιχα. (Πίνακας 11) (Γράφημα 1). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση (r = 0,972-0,984)

Πίνακας 11 Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην ρίζα DPPH

Εκχύλισμα	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	r
Συγκεντρώσεις (µg/ml)		
Υδατικό <i>Mentha microphylla 1</i>	22	0,984
Υδατικό <i>Mentha microphylla 2</i>	24	0,972
Υδατικό <i>Mentha pulegium</i>	26	0,984
Υδατικό <i>Mentha longifolia</i>	28	0,982
Μεθανολικό <i>Mentha pulegium</i>	28	0,982
Μεθανολικό <i>Mentha aquatica</i>	29	0,982
Αιθανολικό <i>Mentha microphylla 1</i>	29	0,983
Υδατικό <i>Mentha aquatica</i>	32	0,982
Μεθανολικό <i>Mentha longifolia</i>	36	0,983
Αιθανολικό <i>Mentha microphylla 2</i>	37	0,982



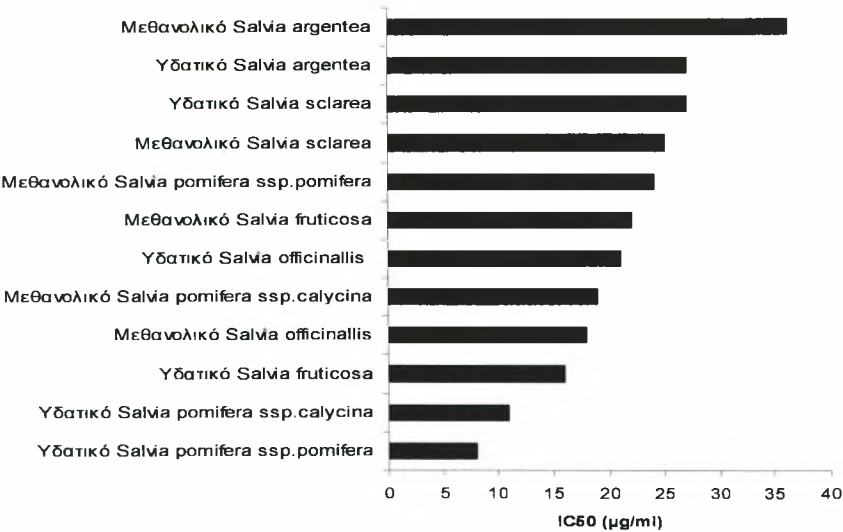
Γράφημα 1 Γραφική απεικόνιση των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων μέντας

3.1.2. Εκχυλίσματα φασκόμηλου

Συνολικά μελετήθηκαν 12 εκχυλίσματα φασκόμηλου. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 8 µg/ml έως 36µg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα ,που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia pomifera ssp.pomifera*, ενώ το πιο ασθενές εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia argentea* με τιμές IC<sub>50</sub> 8µg/ml και 36µg/ml, αντίστοιχα. (Πίνακας 12) (Γράφημα 2). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση (r = 0,917-0,983).

Πίνακας 12 Επίδραση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου στην ρίζα DPPH<sup>•</sup>

Εκχύλισμα	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	r
Συγκεντρώσεις (µg/ml)		
Υδατικό <i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	8	0,982
Υδατικό <i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	11	0,932
Υδατικό <i>Salvia fruticosa</i>	16	0,945
Μεθανολικό <i>Salvia officinallis</i>	18	0,983
Μεθανολικό <i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	19	0,983
Υδατικό <i>Salvia officinallis</i>	21	0,917
Μεθανολικό <i>Salvia fruticosa</i>	22	0,983
Μεθανολικό <i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	24	0,982
Μεθανολικό <i>Salvia sclarea</i>	25	0,982
Υδατικό <i>Salvia sclarea</i>	27	0,982
Υδατικό <i>Salvia argentea</i>	27	0,983
Μεθανολικό <i>Salvia argentea</i>	36	0,983



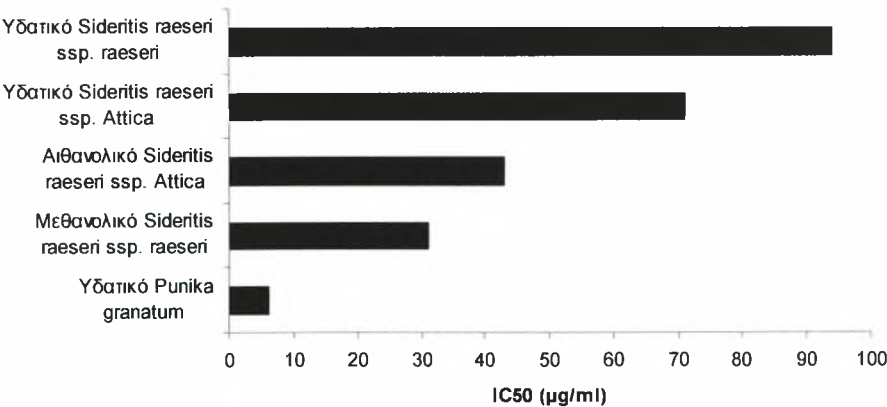
Γράφημα 2 Γραφική απεικόνιση των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων φασκόμηλου

3.1.3. Εκχυλίσματα τσαγιού και ροδιού

Μελετήθηκαν συνολικά ένα εκχύλισμα από τον καρπό ροδιού και 4 εκχυλίσματα από το τσάι του βουνού. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Το εκχύλισμα του ροδιού ήταν ιδιαίτερα ισχυρό με τιμή IC<sub>50</sub> 6 µg/ml ενώ το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> για το τσάι παρουσίασε μεγάλη διακύμανση και κυμαινόταν από 31 µg/ml έως 94µg/ml. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα τσαγιού ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα ,που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp. raeseri*, ενώ το πιο ασθενές εκχύλισμα ήταν το υδατικό, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp. raeseri* με τιμές IC<sub>50</sub> 31µg/ml και 94µg/ml, αντίστοιχα. (Πίνακας 13) (Γράφημα 3). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή συσχέτιση (r = 0,917-0,983).

Πίνακας 13 Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού και ροδιού στην ρίζα DPPH<sup>•</sup>

Εκχύλισμα	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	r
Συγκεντρώσεις (µg/ml)		
Υδατικό <i>Punica granatum</i>	6	0,975
Μεθανολικό <i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	31	0,982
Αιθανολικό <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	43	0,983
Υδατικό <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	71	0,975
Υδατικό <i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	94	0,917



Γράφημα 3 Γραφική απεικόνιση των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού

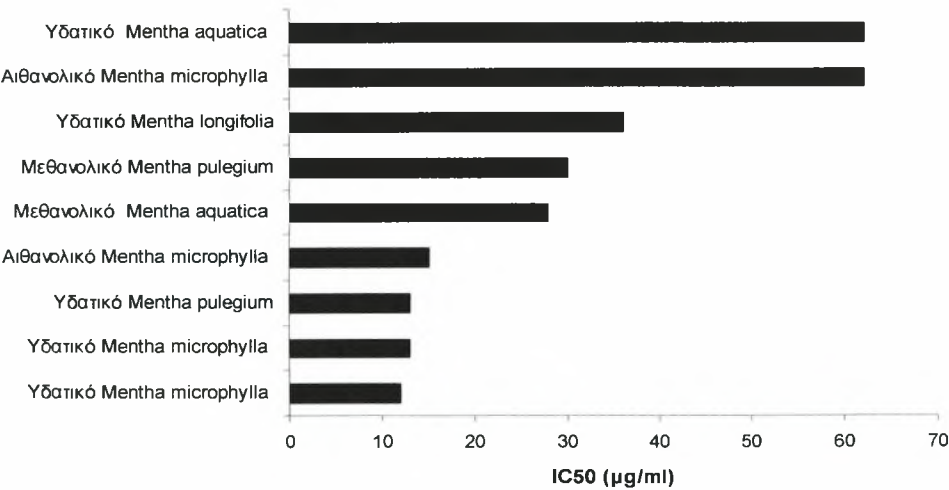
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέντας, φασκόμηλου, τσαγιού και ροδιού μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

3.2.1. Εκχυλίσματα μέντας

Συνολικά μελετήθηκαν 10 εκχυλίσματα μέντας. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 12 µg/ml έως 64µg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha microphylla* 1, ενώ το πιο ασθενές εκχύλισμα ήταν το αιθανολικό, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha longifolia* με τιμές IC<sub>50</sub> 12µg/ml και 64µg/ml, αντίστοιχα. (Πίνακας 14) (Γράφημα 4). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση (r = 0,972-0,973).

Πίνακας 14 Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

Εκχύλισμα	IC <sub>50</sub>	r
Συγκεντρώσεις (µg/ml)	(µg/ml)	
Υδατικό <i>Mentha microphylla</i> 1	12	0,972
Υδατικό <i>Mentha microphylla</i> 2	13	0,972
Υδατικό <i>Mentha pulegium</i>	13	0,973
Αιθανολικό <i>Mentha microphylla</i> 1	15	0,972
Μεθανολικό <i>Mentha aquatica</i>	28	0,972
Μεθανολικό <i>Mentha pulegium</i>	30	0,972
Υδατικό <i>Mentha longifolia</i>	36	0,972
Αιθανολικό <i>Mentha microphylla</i> 2	62	0,972
Υδατικό <i>Mentha aquatica</i>	62	0,972
Μεθανολικό <i>Mentha longifolia</i>	64	0,972



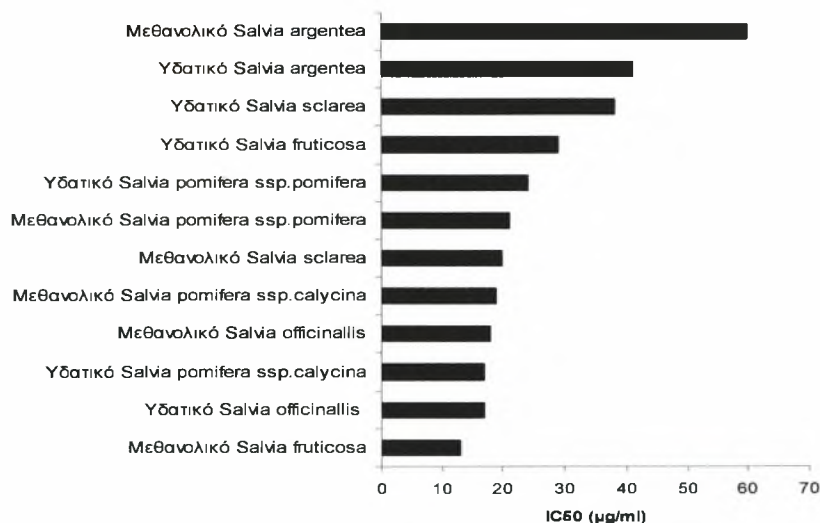
Γράφημα 4 Γραφική απεικόνιση των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων μέντας

### 3.2.2. Εκχυλίσματα φασκόμηλου

Συνολικά μελετήθηκαν 12 εκχυλίσματα φασκόμηλου. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 13μg/ml έως 60μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia fruticosa*, ενώ το πιο ασθενές εκχύλισμα ήταν το υδατικό, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia argentea* με τιμές IC<sub>50</sub> 13μg/ml και 60μg/ml, αντίστοιχα. (Πίνακας 15)(Γράφημα 5). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση (r = 0,972-0,980).

Πίνακας 15 Επίδραση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου στην ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

Εκχύλισμα	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	r
Συγκεντρώσεις (μg/ml)		
Μεθανολικό <i>Salvia fruticosa</i>	13	0,973
Υδατικό <i>Salvia officinallis</i>	17	0,980
Υδατικό <i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	17	0,978
Μεθανολικό <i>Salvia officinallis</i>	18	0,972
Μεθανολικό <i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	19	0,975
Μεθανολικό <i>Salvia sclarea</i>	20	0,972
Μεθανολικό <i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	21	0,972
Υδατικό <i>Salvia pomifer ssp.pomifera</i>	24	0,982
Υδατικό <i>Salvia fruticosa</i>	29	0,972
Υδατικό <i>Salvia sclarea</i>	38	0,973
Υδατικό <i>Salvia argentea</i>	41	0,972
Μεθανολικό <i>Salvia argentea</i>	60	0,972



Γράφημα 5 Γραφική απεικόνιση των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων φασκόμηλου

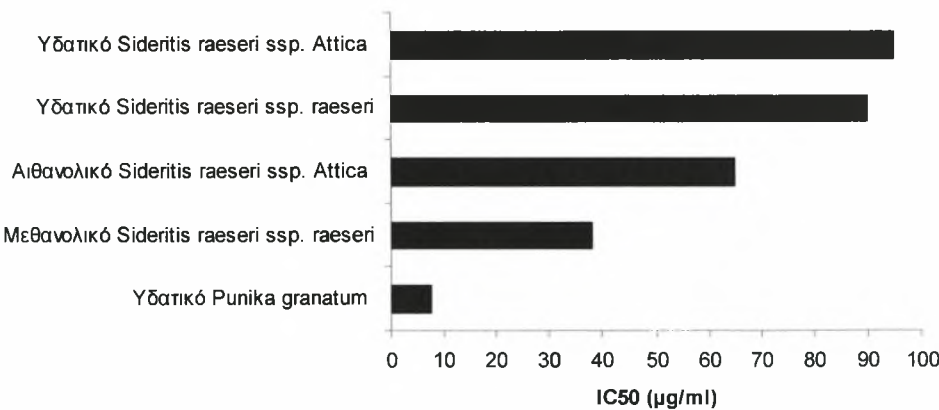


3.2.3. Εκχυλίσματα τσαγιού και ροδιού

Μελετήθηκαν συνολικά ένα εκχύλισμα από τον καρπό ροδιού και 4 εκχυλίσματα από το τσάι του βουνού. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>+</sup>. Το εκχύλισμα του ροδιού ήταν ιδιαίτερα ισχυρό με τιμή IC<sub>50</sub> 7,5 µg/ml ενώ το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> για το τσάι παρουσίασε μεγάλη διακύμανση και κυμαινόταν από 38 µg/ml έως 95µg/ml. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα τσαγιού ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp. raeseri*, ενώ το πιο ασθενές εκχύλισμα ήταν το υδατικό, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp. attica* με τιμές IC<sub>50</sub> 38µg/ml και 95µg/ml, αντίστοιχα. (Πίνακας 16) (Γράφημα 6). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>+</sup> η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση (r = 0,908-0,982).

Πίνακας 16 Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού στην ρίζα ABTS<sup>+</sup>

Εκχύλισμα	IC <sub>50</sub> µg/ml	r
Συγκεντρώσεις (µg/ml)		
Υδατικό <i>Punica granatum</i>	7,5	0,982
Μεθανολικό <i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	38	0,972
Αιθανολικό <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	65	0,972
Υδατικό <i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	90	0,908
Υδατικό <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	95	0,972



Γράφημα 6 Γραφική απεικόνιση των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού

### 3.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων και με τις δύο μεθόδους - DPPH / ABTS

Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων είναι όμοιος τόσο για τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> όσο και για τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, οι οποίες μπορούν να αδρανοποιηθούν είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Όσον αφορά τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και με τις δύο ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και ορισμένες αποκλίσεις, που θα αναλυθούν σε παρακάτω κεφάλαιο.

#### 3.3.1. Εκχυλίσματα μέντας

Συνολικά μελετήθηκαν 10 εκχυλίσματα μέντας. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα μέντας και με τις δύο μεθόδους, ήταν το υδατικό εκχύλισμα της *Mentha microphylla* 1 με τιμή IC<sub>50</sub> 22 μg/ml με τη μέθοδο DPPH και 12 μg/ml με τη μέθοδο ABTS. Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα με τη μέθοδο DPPH ήταν το αιθανολικό της *Mentha microphylla* 2 με τιμή IC<sub>50</sub> 37μg/ml, και με τη μέθοδο ABTS το μεθανολικό εκχύλισμα της *Mentha longifolia* με τιμή IC<sub>50</sub> 64μg/ml, ενώ όπως φαίνεται στον Πίνακα 17 τόσο το αιθανολικό της *Mentha microphylla* 2, όσο και το μεθανολικό εκχύλισμα της *Mentha longifolia* βρίσκονται στις δύο τελευταίες θέσεις ταξινόμησης δραστηριότητας και για τις δύο μεθόδους.

Πίνακας 17 Τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων μέντας και με τις δύο μεθόδους

Φυτό	IC <sub>50</sub> μg/ml DPPH <sup>•</sup>	IC <sub>50</sub> μg/ml ABTS <sup>•+</sup>
Υδατικό <i>Mentha microphylla</i> 1	22	12
Υδατικό <i>Mentha microphylla</i> 2	24	13
Υδατικό <i>Mentha pulegium</i>	26	13
Υδατικό <i>Mentha longifolia</i>	28	36
Μεθανολικό <i>Mentha pulegium</i>	28	30
Αιθανολικό <i>Mentha microphylla</i> 1	29	15
Μεθανολικό <i>Mentha aquatica</i>	29	28
Υδατικό <i>Mentha aquatica</i>	32	62
Μεθανολικό <i>Mentha longifolia</i>	36	64
Αιθανολικό <i>Mentha microphylla</i> 2	37	62

3.3.2. Εκχυλίσματα φασκόμηλου

Συνολικά μελετήθηκαν 12 εκχυλίσματα φασκόμηλου. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα φασκόμηλου με τη μέθοδο *DPPH* ήταν το υδατικό του *Salvia pomifera ssp.pomifera* με τιμή  $IC_{50}$  8μg/ml, ενώ με τη μέθοδο *ABTS* το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa* με τιμή  $IC_{50}$  13μg/ml. Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα και με τις δύο μεθόδους, ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea* με τιμή  $IC_{50}$  36 μg/ml με τη μέθοδο *DPPH* και 60 μg/ml με τη μέθοδο *ABTS*.(Πίνακας 18)

Πίνακας 18 Τιμές  $IC_{50}$  των εκχυλισμάτων φασκόμηλου και με τις δύο μεθόδους

Φυτό	$IC_{50}\mu g/ml$ <i>DPPH</i> <sup>+</sup>	$IC_{50}\mu g/ml$ <i>ABTS</i> <sup>++</sup>
Υδατικό <i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	8	24
Υδατικό <i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	11	17
Υδατικό <i>Salvia fruticosa</i>	16	29
Μεθανολικό <i>Salvia officinallis</i>	18	18
Μεθανολικό <i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	19	19
Υδατικό <i>Salvia officinallis</i>	21	17
Μεθανολικό <i>Salvia fruticosa</i>	22	13
Μεθανολικό <i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	24	21
Μεθανολικό <i>Salvia sclarea</i>	25	20
Υδατικό <i>Salvia sclarea</i>	27	38
Υδατικό <i>Salvia argentea</i>	27	41
Μεθανολικό <i>Salvia argentea</i>	36	60

### 3.3.3. Εκχυλίσματα τσαγιού και ροδιού

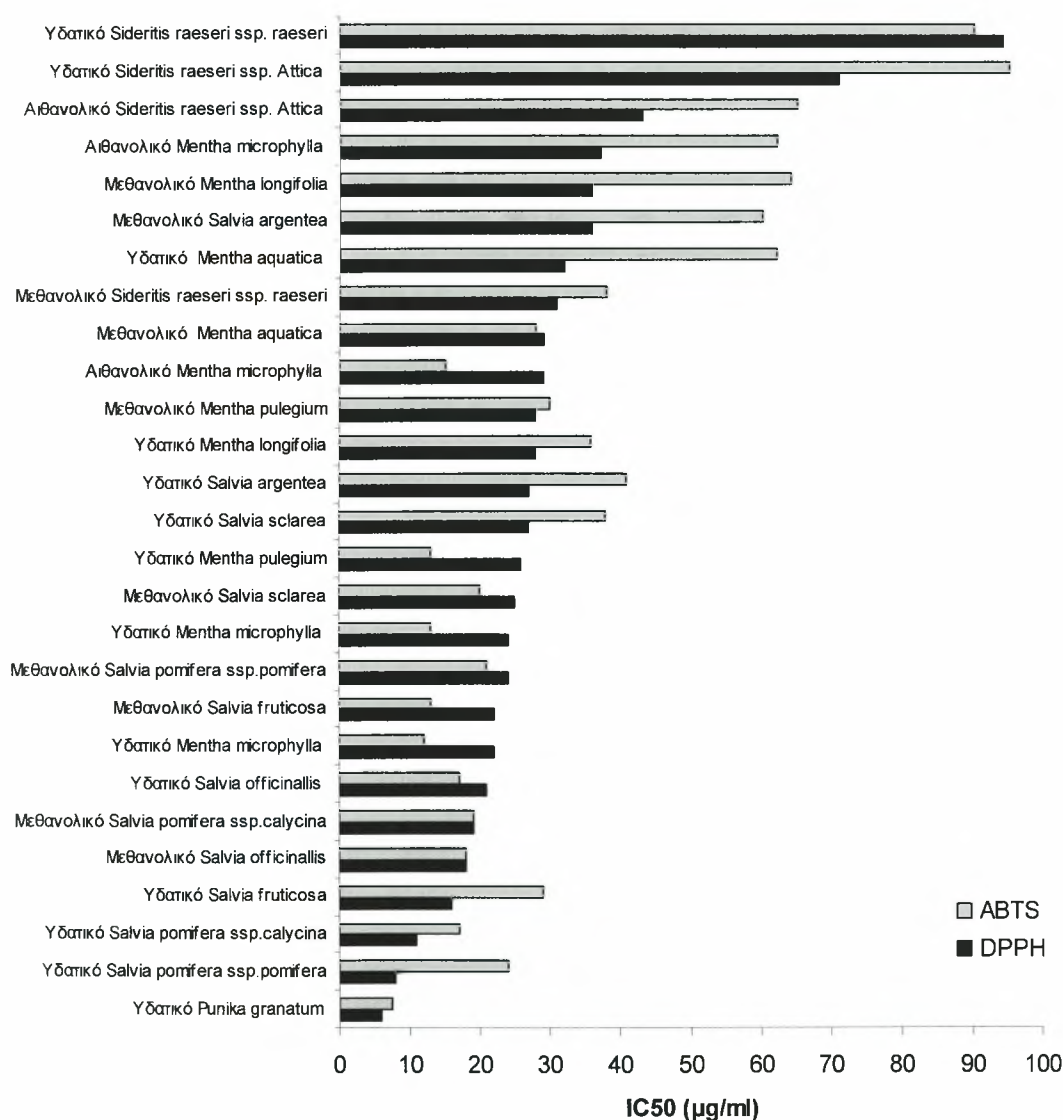
Μελετήθηκαν συνολικά ένα εκχύλισμα από τον καρπό ροδιού και 4 εκχυλίσματα από το τσάι του βουνού. Το εκχύλισμα του ροδιού ήταν ιδιαίτερα ισχυρό με τιμή  $IC_{50}$  6  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο *DPPH* και 7,5  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο *ABTS*. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα τσαγιού και με τις δύο μεθόδους, ήταν το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri ssp. raeseri* με τιμή  $IC_{50}$  31  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο *DPPH* και 38  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο *ABTS*. Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα με τη μέθοδο *DPPH* ήταν το υδατικό του *Sideritis raeseri ssp. raeseri* με τιμή  $IC_{50}$  94 $\mu\text{g/ml}$ , και με τη μέθοδο *ABTS* το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri ssp. attica* με τιμή  $IC_{50}$  95 $\mu\text{g/ml}$ , ενώ όπως φαίνεται στον Πίνακα τόσο το υδατικό του *Sideritis raeseri ssp. attica*, όσο και το υδατικό του *Sideritis raeseri ssp. raeseri* βρίσκονται στις δύο τελευταίες θέσεις ταξινόμησης δραστηριότητας και για τις δύο μεθόδους. (Πίνακας 19)

**Πίνακας 19** Τιμές  $IC_{50}$  των εκχυλισμάτων τσαγιού, ροδιού και με τις δύο μεθόδους

Φυτό	$IC_{50}\mu\text{g/ml}$ <i>DPPH</i> <sup>+</sup>	$IC_{50}\mu\text{g/ml}$ <i>ABTS</i> <sup>++</sup>
Υδατικό <i>Punica granatum</i>	6	7,5
Μεθανολικό <i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	31	38
Αιθανολικό <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	43	65
Υδατικό <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i>	71	95
Υδατικό <i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	94	90

### 3.3.4. Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους

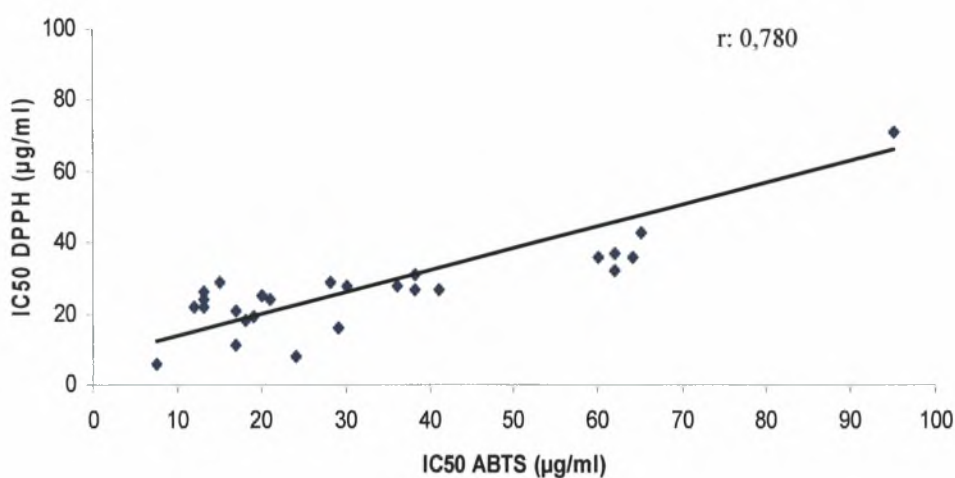
Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το παρακάτω γράφημα διαπιστώνουμε, ότι τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και με τις δύο ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και ορισμένες αποκλίσεις. Το εύρος των τιμών  $IC_{50}$  κυμαινόταν από 6  $\mu\text{g/ml}$  έως 95 $\mu\text{g/ml}$ . Το εκχύλισμα του ροδιού ήταν ιδιαίτερα ισχυρό και μάλιστα το πιο ισχυρό και με τις δύο μεθόδους, από τα εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν, με τιμή  $IC_{50}$  6  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο *DPPH* και 7,5  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο *ABTS* αντίστοιχα. Ενώ ως πιο ασθενή βρέθηκαν το υδατικό του *Sideritis raeseri ssp. attica* και το υδατικό του *Sideritis raeseri ssp. raeseri*, τα οποία βρίσκονται στις δύο τελευταίες θέσεις ταξινόμησης δραστηριότητας και για τις δύο μεθόδους, με τιμές  $IC_{50}$  το μεν *Sideritis raeseri ssp. attica* 71  $\mu\text{g/ml}$  και 95  $\mu\text{g/ml}$  για το *DPPH* και *ABTS* αντίστοιχα και το δε *Sideritis raeseri ssp. raeseri* με τιμές  $IC_{50}$  94  $\mu\text{g/ml}$  και 90  $\mu\text{g/ml}$  για το *DPPH* και *ABTS* αντίστοιχα.



Γράφημα 7 Απεικόνιση των τιμών  $IC_{50}$  των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους



Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ταξινόμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των δύο μεθόδων (Γράφημα 9). Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές  $IC_{50}$  που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους,  $r = 0,780$  με  $p < 0,01$ , παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση.



**Γράφημα 8** Συσχέτιση των τιμών  $IC_{50}$  των δύο μεθόδων

#### 4. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους και του πιθανού ρόλου τους στην πρόληψη ασθενειών, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), ο καρκίνος (Toyokuni, 1998), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), η αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994) και το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992). Έχει αναφερθεί αναφέρον ότι οι πολυφαινόλες ως βιοδραστικά συστατικά των βοτάνων τους προσδίδουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kaefer & Milner 2008). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον επικεντρώνεται κυρίως στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* (Fecka & Turek, 2008) και κυρίως στο δενδρολίβανο, το φασκόμηλο (Erkan et al, 2008), τη ρίγανη, τη μέντα και το θυμάρι (Zandi & Ahmadi, 2000) διότι τα συστατικά των βοτάνων που ανήκουν στην οικογένεια αυτή παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση (Craig, 1999).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων ενδημικών ποικιλιών φασκόμηλου, μέντας, τσαγιού (του βουνού) και ροδιού. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> από αντιοξειδωτικές ενώσεις. Τα εκχυλίσματα, που μελετήθηκαν προέρχονται από τα αρωματικά φυτά *Mentha spp.*, *Salvia spp.*, *Sideritis spp.*, *Punica spp.*, και ήταν τριών τύπων, υδατικά, αιθανολικά και μεθανολικά.

Το σύνολο των 27 εκχυλισμάτων των φυτών παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 6μg/ml έως 94μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Punica granatum* με IC<sub>50</sub> 6μg/ml, ενώ τα πιο ασθενή ήταν τα υδατικά εκχυλίσματα, που προέκυψαν από το τσάι του βουνού *Sideritis raeseri* με τα υποείδη *attica* & *raeseri* με τιμές IC<sub>50</sub> 71 μg/ml και 94μg/ml, αντίστοιχα. Η μελέτη της ικανότητας αλληλεπίδρασης των ίδιων εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, έδειξε επίσης, ότι όλα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 7,5μg/ml έως 95μg/ml, με πιο ισχυρό πάλι το υδατικό εκχύλισμα του ροδιού *Punica granatum* με IC<sub>50</sub> 7,5μg/ml. Αντίθετα, τα πιο ασθενή ήταν τα υδατικά εκχυλίσματα, που προέκυψαν από το τσάι του βουνού *Sideritis raeseri* για τα υποείδη *attica* & *raeseri* με τιμές IC<sub>50</sub> 90 μg/ml και 95μg/ml αντίστοιχα.

Από τα δέκα εκχυλίσματα μέντας, που μελετήθηκαν, το πιο ισχυρό εκχύλισμα και με τις δύο μεθόδους ήταν το υδατικό εκχύλισμα της *Mentha microphylla 1* με τιμή  $IC_{50}$  22  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο DPPH και 12  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο ABTS. Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα με τη μέθοδο DPPH ήταν το αιθανολικό της *Mentha microphylla 2* με τιμή  $IC_{50}$  37 $\mu\text{g/ml}$  και με τη μέθοδο ABTS το μεθανολικό εκχύλισμα της *Mentha longifolia* με τιμή  $IC_{50}$  64 $\mu\text{g/ml}$ . Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στις διαφορετικές ποικιλίες της μέντας οφείλονται στη διαφορετική πολυφαινολική τους σύσταση κάτι που επιβεβαιώνεται και από βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τον χημικό πολυμορφισμό της μέντας αναφορικά με την περιεκτικότητα τους σε βιοδραστικά στοιχεία (Kokkini, 2000). Επίσης και ανάμεσα σε εκχυλίσματα, που έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικός διαλύτης υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές  $IC_{50}$ . Για παράδειγμα, το υδατικό εκχύλισμα *Mentha microphylla 1* είχε τιμή  $IC_{50}$  22  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο DPPH ενώ το αιθανολικό της *Mentha microphylla 2* είχε τιμή  $IC_{50}$ . 37 $\mu\text{g/ml}$  με την ίδια μέθοδο. Μια πιθανή εξήγηση για τις παραπάνω διαφορές είναι η διαφορετική διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων σε μεθανόλη, αιθανόλη και νερό.

Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα του γένους *Mentha*, που μελετήθηκαν έδωσαν όλα στατιστικά σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με μελέτες που έγιναν σε αιθέρια έλαια από πολλά είδη μέντας, όπως *M. spicata*, *M. piperita*, *M. arvensis*, *M. rotundifolia*, *M. suaveolens* and *M. Pulegium* και κατέληξαν, ότι έχουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Daferera et al., 2003; Economou, et al., 1991; Kaur & Kapoor, 2002).

Από τα 12 εκχυλίσματα φασκόμηλου, που μελετήθηκαν το πιο ισχυρό εκχύλισμα φασκόμηλου με τη μέθοδο DPPH ήταν το υδατικό του *Salvia pomifera ssp.pomifera* με τιμή  $IC_{50}$  8 $\mu\text{g/ml}$ , ενώ με τη μέθοδο ABTS το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa* με τιμή  $IC_{50}$  13 $\mu\text{g/ml}$ . Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα και με τις δύο μεθόδους ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea* με τιμή  $IC_{50}$  36  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο DPPH και 60  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο ABTS (Πίνακας 18). Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις εξηγούνται από το γεγονός, ότι πρόκειται για διαφορετικά φυτά με διαφορετική χημική σύσταση. Σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα της μέντα, αυτά του φασκόμηλου δεν παρουσίασαν μεγάλες αποκλίσεις, ανάλογα με τον διαλύτη, που έχει χρησιμοποιηθεί. Τέλος, μια ακόμα παρατήρηση είναι ότι έχουμε διαφορετική ταξινόμηση δραστηριότητας, με τις δύο μεθόδους.

Συμπερασματικά, όλα τα εκχυλίσματα, του γένους *Salvia* έδωσαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Το γεγονός αυτό είναι σε συμφωνία με μελέτες που δείχνουν, ότι το φασκόμηλο παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική δράση, που οφειλόταν σε βιοδραστικά στοιχεία όπως, το καρνοσικό και το ροσμαρινικού οξέος (Yinrong et al., 1999; Thorsen & Hildenbrandt, 2003), τερπενοειδή, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα (Yinrong et al., 2000).

Τέλος, μελετήθηκαν 4 εκχυλίσματα από ποικιλίες τσαγιού του βουνού (*Sideritis*). Το πιο ισχυρό εκχύλισμα και με τις δύο μεθόδους ήταν το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri ssp. raeseri* με τιμή  $IC_{50}$  31  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο DPPH και 38  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο ABTS. Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα με τη μέθοδο DPPH ήταν το υδατικό του *Sideritis raeseri ssp. raeseri* με τιμή  $IC_{50}$  94 $\mu\text{g/ml}$ , και με τη μέθοδο ABTS το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri ssp. attica* με τιμή  $IC_{50}$  95 $\mu\text{g/ml}$  (Πίνακας 19). Οι σημαντικές αποκλίσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στις τιμές  $IC_{50}$  των διαφορετικών ειδών, οφείλονται στην διαφορετική ικανότητα των βιοδραστικών στοιχείων να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες.

Συμπερασματικά όλα τα εκχυλίσματα, του γένους *Sideritis*, έδωσαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα άλλα γένη, που εξετάστηκαν. Φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί σε είδη *Sideritis* είναι φλαβόνες όπως απιγενίνη ή λουτεολίνη (Tomas & Ferres, 1980) καθώς και φαινολικά οξέα τα οποία θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά (Fiamegos et al., 2004).

Το εκχύλισμα του ροδιού, που εξετάστηκε, προερχόταν από τον καρπό του φυτού και ήταν ιδιαίτερα ισχυρό με τιμή  $IC_{50}$  6  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο DPPH και 7,5  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο ABTS. Ήταν το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση όλα τα φυτά, που εξετάστηκαν και με τις δύο τεχνικές. Φαίνεται λοιπόν, ότι ο συνδυασμός των βιοδραστικών συστατικών που περιέχει το ρόδι μπορεί αποτελέσει σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών με πιθανή χημειοπροστατευτική δράση (Lansky et Newman, 2007).

Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν προσδιορίζουν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων λόγω της αυτονόητης δυσκολίας διαχωρισμού και μέτρησης κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά και των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών. Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση ( $r=0,780$  με  $p<0,01$ ). Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στη διαφορετική φύση των ριζών και στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι πρόκειται για εκχυλίσματα και όχι για απομονωμένα συστατικά των φυτών, γεγονός που μπορεί να μεταβάλλει την ικανότητα αλληλεπίδρασης των πολυφαινολών με τη ρίζα. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και ο διαλύτης των εκχυλισμάτων καθώς τα υδατικά εκχυλίσματα μέντας ακολουθούν την ίδια σειρά ταξινόμησης και με τις δύο μεθόδους σε αντίθεση με τα αιθανολικά και τα μεθανολικά, πιθανών λόγω της διαφορετικής διαλυτότητας των πολυφαινολικών ενώσεων. Συνολικά, όλα τα εκχυλίσματα της οικογένειας Χειλανθών, που εξετάστηκαν παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και θα πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η δράση αυτή.



## 5. Βιβλιογραφία

- **Abu-Amsa R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot M, Beilin LJ**, “*Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine*”, Clinical Science, 91: 449–458, 1996.
- **Armata M, Gabrieli C, Termentzi A, Zervou M, Kokkalou E**, “*Constituents of sideritis syriaca ssp. syriaca (Lamiaceae) and their antioxidant capacity*”, Food Chemistry, 111: 179-186, 2008.
- **Awika JM, RooneyLW, Wu X, Prior RL., Cisneros-Zevallos L**, “*Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products*” , J Agric Food Chem, 51: 6657-6662, 2003.
- **Aviram M, Dornfeld L**, “*Methods of using pomegranate extracts for causing regression in lesions due to arteriosclerosis in humans*”, US Patent 6,641, 2003.
- **Baden C**, “*Sideritis L.*”, Mountain Flora of Greece, Vol. 2: 84-91.: 1991.
- **Barberan FAT, Nunez JM, Tomas F**, “*An HPLC study of flavones from some Spanish Sideritis species*”: Phytochemistry, vol. 24, no. 6, 1285-1288, 1985.
- **Baruchel S, Wainberg MA**, “*The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus*”: Journal of Leukocyte Biology, 52, 111–114: 1992.
- **Benzie IFF, Strain JJ**, “*The ferric reducing abilityof plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay*”: Anal Biochem, 239, 70–76, 1996.
- **Bhat KP, Pezzuto JM**, “*Cancer chemopreventive activity of resveratrol*”: Acad Sci., 957:210-229: 2002.
- **Bishop DJM, Weinberg RA**, “*The themes hallmarks in of Cancer*”, Cell, 00:57-70, 2000.
- **Bors W, Heller W, Michel C, Saran M**, “*Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies*”, Methods in Enzymology, 186, 343–355, 1990.
- **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C**, “*Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*”, Food Science and Technology, 28, 25–30, 1995.
- **Bravo L**, “*Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*”, Nutr Rev, 56, (11): 317-33, 1998.
- **Cammac R**, “*Electron spin response*”, The biochemistry of plants, Vol 13, 229-57, 1987.
- **Cano A, Hernandze-Ruiz J, Garcia-Canovas F, Acosta M, Arnao MB**, “*An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material*”, Phytochem Anal, 9, 196-202, 1998.
- **Cao G, Prior RL**, “*The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples*”, Methods Enzymol, 299, 50-62, 1999.
- **Cao GH, Sofic E, Prior R**, “*Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships*”, Free Radical Biology & Medicine, 22, 749–760, 1997.
- **Caragay AB**, “*Cancer- preventative foods and ingredients*” Food Tech 46(4), 65-68: 1992.
- **Chadwick DJ, Whelan J**, “*Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*” J. Wiley, 1992.
- **Cheeseman KH, Slater TF**, “*An introduction to free radical biochemistry*” : Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin, vol 49, 481-93, 1993.

- **Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J**, “Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups” *Chemistry and Physics of Lipids* 76, 157–163, 1996.
- **Cheyrier V**, “Polyphenols in foods are more complex than often thought”, *Am J Clin Nutr*, 81:223–9, 2005.
- **Craig WJ**, “Health Promoting Properties of Common Herbs”, *Am. J Clin Nutr* 70(3): 491-499, 1999.
- **Daferera DJ, Ziogas B N, Polissiou MG**, “The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*”, *Crop Protection*, 22: 39–44, 2003.
- **Dew T, Day A, Morgan M**, “Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components” Department of Food Science, University of Leeds, 2005.
- **Diplock AT**, “Low dietary selenium and its relationship to human disease” In: Parke DV, Ioannides C & Walker R, *Food Nutrition and Chemical Toxicity*, 395–402, 1993.
- **Donnelly JK, Robinson DS**, “Superoxide Dismutase”: *Oxidative Enzymes in Foods* Robinson and Eskin, Elsevier Applied Science, 49-91: 1991
- **Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk L**, “Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress”, *Progr Lipid Res*, 43: 200-227, 2004.
- **Duthie G**, “Determination of activity of antioxidants in human subjects”, *Proceedings of the Nutrition Society* 58: 1015-1024, 1999.
- **Economou KD, Oreopolou O, Thomopoulos C D**, “Antioxidant activity of some plant extracts of the family *Labiatae*”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68: 109–113: 1991.
- **Elliot RH, Strunin L**, “Hepatotoxicity of volatile anaesthetics”, *British Journal of Anaesthesia*, 70: 339–349, 1993.
- **Eriksson CE, Na A**, “Antioxidant agents in raw materials and processed foods”, *Bioch Soc Sym*, 61: 221-234, 1995.
- **Evans PH**, “Free radicals in brain metabolism and pathology”, *British Medical Bulletin*, 49: 577–587, 1993.
- **Fecka I, Turek S**, “Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: Thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques”, *Food Chemistry*, 108(3): 1039-1053, 2008.
- **Fereidoon S**, “Antinutrients and Phytochemicals in Foods”, No 662, American Chemical Society Division of agriculture: 1998.
- **Fiamegos YC, Nanos CG, Vervoort J, Stalikas CD**, “Analytical procedure for the in-vial derivatization- extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection”, *J chromatogram*, 1041 (1-2), 2004.
- **Foti MC, Daquino C, Geraci C**, “Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions”, *J Org Chem* 9:2309–2314, 2004.
- **Frankel EN, Meyer AS**, “The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants”, *J Sci Food Agric*, 80: 1925-1941, 2000.
- **Gilbert D.L**, “Fifty years of radical ideas”, *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000

- **Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS** “Chemoprevention”, *CA Cancer J Clin*, 45: 31-49, 1995.
- **Gulluce M, Sokmen M, Sahin F, Sokmen A, Adiguzel A, Ozer H**, “*Biological activities of the essential oil and methanolic extract of Micromeria fruticosa (L) Druce ssp. serpyllifolia(Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey*”, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 84: 735–741, 2004.
- **Gulluce M, Sahing F, Sokmend M, Ozerc H, Dafereraf D, Sokmene A, Polissiou M., Adiguzelb A, Ozkana H**, “*Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia*”, *Food Chemistry*, 103: 1449–1456, 2007.
- **Gutteridge JMC**, “*Lipid Peroxidation and Antioxidants as biomarkers of tissue damage*”, in *Chem*, 41: 1819 – 2812, 1995.
- **Halliwell B and Gutteridge JMC**, “*Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview*”, in *Parker L, Glazer AN, Methods in Enzyme bgy* 186, 1990.
- **Halliwell B, Gutteridge JMC**, “*Free Radicals in Biology and Medicine*”, 11: 416-493, 188-266, 1989.
- **Halliwell B, Gutteridge JMC**, “*The antioxidants of human extracellular fluids*”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1–8, 1990.
- **Halliwell B**, “*Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation and the effect of antioxidants*”, *American Journal of Clinical Nutrition* 61, 670–677, 1995.
- **Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI**, “*The characterization of antixoidants*”, *Food Chemical Toxicity*, 33: 601–617, 1995.
- **Halliwell B**, “*Free Radicals and otherreactive species in Disease*”, *National University of Singapore*, 2001.
- **He G, Samouilov A., Kuppusamy P, Zweier JL**, “*In vivo imaging of free radicals: Applications from mouse to man*”, *Mol Cell Biochem*, 234: 359-367, 2002.
- **Hill MJ**, “*Introduction: dietary fibre, butyrate and colerectal cancer*”, *European Journal of Cancer Prevention*, 4: 341–344, 1995.
- **Ho CT, Wang GJ, Huang TC, Huang MT**, “*Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage*”, *Biofactors*, 13: 161-166, 2000.
- **Hu FB, Willett WC**, “*Optimal diets for prevention of coronary heart disease*”, *JAMA*, 288: 2569-2578, 2002.
- **Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL**, “*High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format*”, *J Agric Food Chem*, 50, 4437-4444, 2002.
- **Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK**, “*Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated cyclodextrin as the solubility enhancer*”, *J Agric Food Chem*, 50: 1815-1821, 2002.
- **Hurst R, Bao Y, Ridley S, Williamson G**, “*Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin*”, *Biochem J*, 338: 723–728, 1999.

- **Indu Pal K, Thiraviam G**, “*Mini-Reviews in Medicinal Chemistry Screening Methods for Antioxidants-A Review Department of Pharmaceutics*”, University Institute of Pharmaceutical Sciences, 6: 305-312, 2006.
- **Heim K**, “*Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*”, Journal of Nutritional Biochemistry, 13: 572-584, 2002.
- **Kaefer CM, Milner JA**, “*The role of herbs and spices in cancer prevention*”, Journal of Nutritional Biochemistry, 19(6): 347-361, 2008.
- **Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M**, “*Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds*”, J. Agric Food Chem, 47(10): 3954-3962, 1999.
- **Kaur C, Kapoor HC**, “*Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables*”, International Journal of Food Science and Technology, 37(2), 153–161, 2002.
- **Kawamukai M**, “*Biosynthesis, Bioproduction and Novel Roles of Ubiquinone*”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94: 511-517, 2002.
- **Keaney J, Vita J**, “*Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action*”, Prog Cardiovasc Dis, 38: 129-54, 1995.
- **Kochlar SP, Russell JB**, “*Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food Systems*” in: Food Antioxidants. Hudson, Elsevier Applied Science (Eds), London and New York, pp 19-64: 1990.
- **Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E**, “*Herbs of the Labiatae*”, Elsevier Science Ltd, 2003.
- **Kokkini S**, “*Biologically active plant compounds*”, Elsevier Science Ltd, 2003.
- **Kokkini S, Karousou R, Lanaras T**, “*Essential oils of spearmint (Carvone-rich) plants from the island of Crete*”, Biochemical Systematics and Ecology, 23(4), 425–430, 1995.
- **Kristi A, Steinmetz RD Potter J**, “*Vegetables, Fruit, and Cancer, Prevention: A Review*”; Journal of the American Dietetic Association, 96(10): 1027-1039, 1996.
- **Koutsos T, Chatzopoulou P**, “*European report of a working group on medicinal and aromatic plants: Sideritis species in Greece: the current situation*”, Cooperative Programme for Plant Genetic Resources, Bioversity International, 2007.
- **Koyama S, Cobb L, Mehta H, Seeram N, Heber D, Pantuck A, Cohen P**, “*Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF–IGFBP axis Growth Hormone & IGF*”, Research, 20(1) : 55-62, 2010.
- **Lansky EP**, “*Pomegranate supplements prepared from pomegranate material including pomegranate seeds*”, US Patent 6: 060-063, 2000.
- **Lansky E, Harrison G, Froom P, Jiang W**, “*Pomegranate (Punica granatum) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™*”, Investigational New Drugs, 23: 121–122, 2005.
- **Lansky E, Newman AR** “*Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*”, Journal of Ethnopharmacology, 109: 177–206, 2007.
- **Laranjinha JAN, Almeida LM, Madeira VMC**, “*Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation*”, Biochemical Pharmacology, 48: 487–494, 1994.

- **Lee J, Watson RR**, “*Pomegranate: a role in health promotion and AIDS?*”, *Nutrients and Foods in AIDS*: 179–192, 1998.
- **Lee JY, Hwang WI, Lim ST**, “*Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A*”, *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3): 409–415, 2004.
- **Levin GM**, “*Pomegranate (*Punica granatum*) plant genetic resources in Turkmenistan*”, *Plant Genetic Resources Newsletter*, 97: 31–37, 1994.
- **Loew & Oscar**, “*A New Enzyme of General Occurrence in Organisms*”, *Science*, 11: 701-2, 1900.
- **Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M**, “*Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions*” *Biochim Biophys Acta*, 1472: 142-152, 1999.
- **Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B**, “*An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease*”, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.
- **MacDonald-Wicks L, Wood L, Garg M**, “*Review Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro*”, *School of Health Sciences, University of Newcastle*, 2006.
- **Madsen HL, Bertelsen G**, “*Spices as antioxidants*”, *Food Science and Technology*, 6(8): 271-276, 1995.
- **Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L**, “*Polyphenols: Food sources and bioavailability*”, *Am J Clin Nutr*, 79: 727-747, 2004.
- **Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C and Giovannini C**, “*Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes*”, *J. Nutr.Biochem*. 16: 577-586: 2005.
- **Menghini L, Massarelli P, Bruni G, Menghini A**, “*Preliminary evaluation on anti-inflammatory and analgesic effects of *Sideritis syriaca* L. herba extracts*”, *Journal of Medicinal Food*, 8(2): 227-231, 2005.
- **Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A**, “*A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*”, *Clinical Science*, 84: 407–412, 1993.
- **Mimica-Dukic N, Popovic M, Jakovljevic V, Szabo A, Gasic O**, “*Pharmacological studies of *Mentha longifolia* phenolic extracts II. Hepatoprotective activity*”, *Pharmaceutical Biology*, 37(3): 221–224, 1999.
- **Molyneux P**, “*The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*”, *J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219, 2004.
- **Monfared A, Nabid MR, Rustaiyan A**, “*Composition of a carvone chemotype of *Mentha longifolia* (L.)*”, *Journal of Essential Oil Research*, 14(1): 51–52, 2002.
- **Morton LW, Caccetta RAA, Puddey IB, Croft KD**, “*Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease*”, *Clin Epser Pharm Phys*, 27: 152-159, 2000.
- **Nagata H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T, Watanabe**, “*Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase*”, *J Exp Clin Med*, 24: 1-11, 1999.



- **Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G., Gentili V, Di Felice N, Scaccini C**, "*Inhibition of human LDL oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives*", *Free Radical Biology and Medicine*, 19:541–552, 1995.
- **Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB**, "*Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 9090–9095, 1996.
- **Noruma T, Kikuch M, Kawakami Y**, "*Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)*", *Biochem. Mol. Biol. Int*, 42: 361-370, 1997.
- **Ozgen M, Reese N, Tulio A, Scheerens J, Miller R**, "*Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods*", *J Agric Food Chem*, 54: 1151-1157, 2006.
- **Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis E, Soleas G, Goldberg DM**, "*The red wine phenolics trans-resveritrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease*", *Clinica Chimica Acta*, 235: 207–219, 1995.
- **Pai E, Schulz G**, "*The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates*", *J Biol Chem*, 258: 1752-1757, 1983.
- **Papanicolaou K, Kokkini S**, "*A thin-layer chromatographic study of some chemical leaf constituents in *Sideritis L. sect. Empedoclia* (Rafin.) Bentham (Labiatae) in Greece*", *Feddes Repertorium* 95(5-6):359-368, 1984.
- **Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV, Parke DV**, "*Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases*", *Inflammopharmacology*, 1: 3–36: 1991.
- **Parke A, Parke DV**, "*The pathogenesis of inflammatory disease: surgical shock and multiple system organ failure*", *Inflammopharmacology*, 3: 149–168, 1995.
- **Prior R, Xianli W, Schaich K**, "*Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*", *J Agric Food Chem*, , 53 (6) : 1841-1856, 2005.
- **Popov I, Lewin G**, "*Antioxidative homeostasis: characterisation by means of chemiluminescent technique*", *Meth Enzymol*, 300: 437–456, 1999.
- **Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannal A, Yan M, Rice- Evans C**, "*Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*", *Free Radicle Biology and Medicine*, 26: 1231–1237, 1999.
- **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G**, "*Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*", *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 9: 1996.
- **Roeser H, Illee G, Naght S, Cartwright G**, "*The Role of Ceruloplasmin in Iron Metabolism*", *The Journal of Clinical Investigation*, 49, 1970.
- **Sanchez-Moreno C**, "*Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*", *Food Sci Technol Int*, 8 (3): 121-137, 2002.
- **Sanchez-Moreno JA, Larrauri Saura-Calixto FA**, "*Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270–276, 1998.

- **Samaras G, Chatzopoulou P, Goliaris A, Mitsogiannis D, Galanopoulou S**, “*The effect of the altitude on the yield and quality of the essential oil from Greek mountain tea. In: Book of Abstracts. 2nd Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*”, 85, 2002.
- **Scalbert A, Williamson G**, “*Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols*”, J Nutr , 130: 2073-2085, 2000.
- **Schlesier K, Harwat M, BO V, Bitschr M**, “*Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods*”, Free Radical Research, 36 (2): 177–187, 2002.
- **Shahidi F, Wanasundara J**, “*Phenolic antioxidants*”, Crit Rev Food Sci Nutr, 32: 67-103, 1992.
- **Shahin Sharif A, Naresh K, Abhinav L, Angad S, Hallihosur S, Abhishek S, Utpal B**, “*Indian medicinal herbs as sources of antioxidants*”, Food Research International, 41(1): 1-15, 2008.
- **Shiraishi T, Abe M, Miyagawa T**, “*Cheese foods containing conjugated polyunsaturated fatty acid glycerides*”, Japanese Patent: JP 2002176913, 2002.
- **Sies H, Stahl W, Sundquist A**, “*Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids*”, Annals of the New York Academy of Sciences, 669: 7-20, 1995.
- **Simon JE, Chadwick AF, Craker LE**, “*Herbs: An Indexed Bibliography 1971-1980*”, The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, 29(3): 294-296, 1986.
- **Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D**, “*The role of oxidative stress in the genesis of heart disease*”, CardioVasc Res, 40: 426-432, 1998.
- **Skoula M, Abbes J, Johnson C**, “*Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of Salvia fruticosa mill growing in Crete*”, Biochemical Systematics and Ecology, 28:551-561, 2000.
- **Smith C, Mitchinson MJ, Arudma OI, Halliwell B**, “*Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions*”, Biochemical Journal, 286: 901–905, 1992.
- **Spiridon E, Kintzios M, Baberaki G**, “*Plants that Fight Cancer*”, Taylor & Francis: 2004
- **Steinmetz KA, Potter JD**, “*Vegetables, fruit and cancer preventions a review*”, J Am Diet Assoc, 96: 1027-1039, 1996.
- **Syed D, Afaq F, Mukhtar H**, “*Pomegranate derived products for cancer chemoprevention*”, Phytonutrients, 17(5): 377-385, 2007.
- **Thomas J, Maiorino M, Ursini F, Girotti W**, “*Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane- damaging lipid peroxidation; in situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides*”, J Biol Chem, 265: 454-461: 1990.
- **Thomas SR, Witting PK, Stocker R**, “*3-Hydroxyanthranilic acid is an efficient, cell-derived co-antioxidant for α-tocopherol, inhibiting human low density lipoprotein and plasma lipid peroxidation*”, Journal of Biological Chemistry, 271: 32714–32721, 1996.
- **Tomas F, Ferreres F**, “*Two flavone glucosides leucantha. From Sideritis*”, Phytochemistry, 19 (9): 2039-2040, 1980.
- **Toyokuni S**, “*Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation*”, Biotherapy, 11: 147-154, 1998.

- **Urquiaga I, Leighton F**, “*Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress*”, *Biol Res*, 33(2): 55-64: 2000.
- **Valavanidis A**, “*Free radicals in organic chemistry*”, University of Athens, 2006.
- **Van Acker SA, Van Denberg, DJ, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Dervijgh WJF, Bast A**, “*Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*”, *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 331–342, 1996.
- **Van Kuijk F, Sevanian A, Handelman G, Dratz E**, “*A new role for phospholipase A2: protection of membranes from lipid peroxidation damage*”, *TIBS*, 12: 31-34, 1987.
- **Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, Laranjinha, J., Almeida, L., Salvayre, R. and Negre Salvayre A**, “*Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL*”, *British Journal of Pharmacology*, 123: 565–573, 1998.
- **Villar A, Simeon S, Jimenez FJ, Rios JL, Zafra Polo CM**, “*Screening phytochimique d’espèces de Sideritis*”([Phytochemical screening of Sideritis species), *Fitoterapia*, 6:366-368, 1984.
- **Villar A, Jimenez A, Manez S**, “*Sur la distribution des methoxyflavones dans le genre Sideritis, plantes medicinales et phytotherapie*”, 4: 255-261, 1985.
- **Waring W**, “*Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke*”, *Q J Med*, 95: 691-693: 2002.
- **Watanabe K, Hatakoshi M**, “*Punica granatum leaf extracts for inactivation of allergen*”, *Japan Kokai Tokkyo Koho (Japanese patent) JP 2002370996*, 2002.
- **Wattenberg L W**, “*Chemoprevention of cancer*”, *Cancer Res*, 45: 1-8, 1985.
- **Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S**, “*A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability*”, *Free Radic. Biol. Med*, 18: 29–36, 1985.
- **Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S**, “*Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins*”, *Fed Eur Biochem Soc Lett*, 187: 33–37, 1985.
- **Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C**, “*Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules?*”, *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (7): 838-849, 2004.
- **Williamson G., Manach C**, “*Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies*”, *Am J Clin Nutr*, 81, 243-255, 2005.
- **Wilson RL**, “*Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In biochemical mechanism of liver injuries*”, *New York Academic Press*: 123-224, 1978.
- **Winston GW, Regoli F, Dugas AJ, Fong JH, Blanchard KA**, “*A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids*”, *Free Radical Biol Med*, 24: 480-493, 1998.
- **Yamanaka N, Oda O, Nagao S**, “*Pro-oxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavenoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation.*”, *FEBS*, 405: 186–190, 1997.
- **Yang CS, Landau JM, Huang M, Newmark**, “*Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*”, *Annual Review of Nutrition*, 21: 381-406, 2001.
- **Yinrong L, Yeap Foo L**, “*Flavonoid and phenolic glycosides from Salvia officinalis*”, *Phytochemistry*, 55: 263-267, 2000.

- **Yinrong L, Yeap Foo L**, “*Rosmarinic acid derivatives from Salvia officinallis*”, *Phytochemistry*, 51: 91-94, 1999.
- **Zandi P, Ahmadi L**, “*Antioxidant effect of plant extracts of Labiatae family*”, *J Food Sci Technol*, 37: 436–439, 2000.
- **Zheng W, Wang SY**, “*Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*”, *J Agric Food Chem*, 49: 5165-5170, 2001.

